



Valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique par digestion anaérobie : Prétraitement fongique aérobie

Xun Liu

► To cite this version:

Xun Liu. Valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique par digestion anaérobie : Prétraitement fongique aérobie. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Lyon, 2015. Français. NNT : 2015ISAL0099 . tel-01367705

HAL Id: tel-01367705

<https://theses.hal.science/tel-01367705>

Submitted on 16 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

**Valorisation énergétique de la biomasse
lignocellulosique par digestion anaérobie :
prétraitement fongique aérobie**

présentée devant

L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

pour obtenir le grade de docteur

Formation doctorale : Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain

École doctorale : École doctorale de Chimie de Lyon

Par **Xun LIU**

Soutenance le 18 décembre 2015 devant la Commission d'examen

Jury

Directeur de thèse	Rémy Bayard	Maître de Conférences, HDR, INSA Lyon LGCIE-DEEP
Rapporteur	Hélène Carrère	Directrice de Recherche, HDR, LBE INRA Narbonne
Rapporteur	Geneviève Feuillade	Professeur, GRESE ENSIL
Examineur	Christine de Brauer	Professeur, INSA Lyon LGCIE- DEEP
Examineur	Rémy Gourdon	Professeur, INSA Lyon LGCIE- DEEP
Examineur	Serge Hiligsmann	Docteur, CR ULG Belgique

Laboratoire de recherche : LGCIE - Laboratoire de Génie Civil et d'Ingénierie Environnementale de l'INSA de Lyon

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Sec : Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e etage 04 72 43 80 46 Insa : R. GOURDON secretariat@edchimie-lyon.fr	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Sec : M.C. HAVGODOUKIAN Ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60.97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Sec : Safia AIT CHALAL Bat Atrium- UCB Lyon 1 04.72.44.83.62 Insa : S. REVERCHON Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr	M. Fabrice CORDEY Laboratoire de Géologie de Lyon Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Géode – Bureau 225 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.44.83.74 Sylvie.reverchon-pescheux@insa-lyon.fr fabrice.cordey@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ http://www.ediss-lyon.fr Sec : Safia AIT CHALAL Bat Atrium – UCB Lyon 1 04 72 44 83 62 Insa : Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr	Mme Emmanuelle CANET-SOULAS INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 avenue Jean Capelle INSA de Lyon 69621 Villeurbanne Tél : 04.72.11.90.13 Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr Sec :Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e etage infomaths@univ-lyon1.fr	Mme Sylvie CALABRETTO LIRIS – INSA de Lyon Bat Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 43. 80. 46 Fax 04 72 43 16 87 Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON http://ed34.universite-lyon.fr Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 71.70 Fax 04 72 43 85 28 Ed.materiaux@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://mega.universite-lyon.fr Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72 .43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/ Sec : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS Insa : J.Y. TOUSSAINT viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr	Mme Isabelle VON BUELTZINGLOEWEN Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 isavonb@dbmail.com

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Résumé

La bioconversion en méthane de biomasses lignocellulosiques est l'une des alternatives les plus prometteuses pour la production de méthane issu de la digestion anaérobie. Toutefois, les biomasses lignocellulosiques présentent des caractéristiques bio-physico-chimiques très variables en raison leur composition biochimique et de l'organisation structurale très diverses. Par ailleurs, leur faible biodégradabilité en conditions anaérobie nécessite de les prétraiter avant méthanisation pour optimiser la production de méthane.

Ce travail vise à évaluer l'influence des caractéristiques d'une large gamme de substrats lignocellulosiques sur leur biodégradabilité anaérobie et les corrélations entre leurs caractéristiques bio-physico-chimiques et le potentiel biométhanogène, et d'étudier les effets du prétraitement fongique en présence de *Ceriporiopsis subvermispota* sur le potentiel biométhanogène de biomasses lignocellulosiques sélectionnées dans la présente étude et de caractériser les changements de leurs caractéristiques après le prétraitement fongique.

La caractérisation de 36 biomasses lignocellulosiques représentatives d'une large gamme de gisements potentiellement mobilisables a permis de mettre en évidence les corrélations linéaires entre le potentiel biométhanogène des biomasses et certaines de leur caractéristiques bio-physico-chimiques, dont la teneur en lignine et la demande biochimique en oxygène. Les biomasses sylvicoles et agricoles ont montré des caractéristiques distinctes de la biodégradabilité aérobie et anaérobie.

Les résultats de prétraitement fongique sur les 5 biomasses ont permis de mettre en évidence que le champignon de pourriture blanche *Ceriporiopsis subvermispota* réagit distinctement selon la biomasse prétraitée. Pour certaines biomasses, le prétraitement fongique conduit à augmenter significativement la production de méthane et la vitesse de bioconversion en méthane. Cette espèce présente la capacité de dégrader sélectivement la lignine sur certaines biomasses et, sur d'autres, celle de dégrader de manière non-sélective des polysaccharides et des lignines. De plus, pour les deux souches de *Ceriporiopsis subvermispota* testées, des métabolismes différents ont été mis en évidence sur une même biomasse. Les résultats de compositions et ceux de l'analyse structurale des biomasses (initiales, autoclavées, contrôles, et prétraitées par *Ceriporiopsis subvermispota*) ont montré que leur structure peut être modifiée sans toutefois observer une transformation significative de leur composition biochimique.

Mots-clés : Digestion anaérobie, Potentiel biométhanogène, Résidus lignocellulosiques, Analyses biochimiques, Hydrolyse enzymatique, *Ceriporiopsis subvermispota*, Champignon de pourriture blanche

Abstract

Bioconversion to methane lignocellulosic biomass is one of the most promising alternatives for the production of methane from anaerobic digestion. However, lignocellulosic biomass has various biophysicochemical characteristics due to their biochemical composition and diverse structural organization. Moreover, their low biodegradability in anaerobic condition requires pretreatment before methanation to optimize methane production.

This work aims to evaluate the influence of the characteristics of a wide range of lignocellulosic substrates on their anaerobic biodegradability and correlations between their bio-physical-chemical characteristics and biomethane potential, and study the effects of fungal pretreatment in the presence of *Ceriporiopsis subvermispota* on the biogas potential of lignocellulosic biomass selected in this study and characterize their changes of their characteristics before and after the fungal pretreatment.

The characterization of 36 representative lignocellulosic biomass of a wide range of potentially mobilized deposits allowed to highlight the linear correlations between biomethane potential of biomass and some of their bio-physical-chemical characteristics, of which the lignin content and biochemical oxygen demand. The forest and agricultural biomass exhibited distinct characteristics of the aerobic and anaerobic biodegradability.

The results of fungal pretreatment of the 5 biomass indicated that the white rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota* reacts distinctly depending on the pretreated biomass. For some biomass, fungal pretreatment leads to significant increase of methane production and the bioconversion rate of methane. This species presents the ability to selectively degrade lignin on some biomasses, in others, the ability to non-selectively degrade polysaccharides and lignins. In addition, for both strains of *Ceriporiopsis subvermispota* tested, different metabolisms were highlighted on the same biomass. The results of compositions and those of the structural analysis of biomass (initials, autoclaved, controls, and pretreated with *Ceriporiopsis subvermispota*) showed that their structure can be modified without observing a significant transformation of their biochemical composition.

Keywords: Anaerobic digestion, Biomethane potential, Lignocellulosic residues, Biochemical analyses, Enzymatic hydrolysis, *Ceriporiopsis subvermispota*, White-rot fungi

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, Rémy Bayard, pour toute son aide, gentillesse et patience tout au long de ce travail. Je suis ravie d'avoir travaillé avec lui, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller.

Je voudrais également remercier Christine De Brauer, Hassen Benbelkacem, Serge Hiligsmann, Rémy Gourdon, Jean-Baptiste Aubin et Pierre Buffière pour m'avoir aidée et avoir consacré leur temps à ma thèse.

Je tiens à remercier Nathalie Dumont pour m'avoir aidée à mettre en place des méthodes de manipulations et à faire des analyses. Je remercie également Hervé Perier Camby, David Lebouil, Richard Poncet pour m'avoir aidée à la réalisation d'appareil de manipulations et à faire des analyses.

Je remercie aussi les rapporteurs, Hélène Carrère de l'INRA Narbonne, et Geneviève Feuillade de GRESE ENSIL pour la présence et l'évaluation de ce travail.

Je remercie sincèrement toutes les personnes du labo, particulièrement tous les doctorants, docteurs et post-docs du labo. L'ambiance du labo était très agréable. Vous êtes tous sympathiques et gentils avec moi. Je vous remercie pour m'avoir aidée à découvrir la culture française mais aussi celle du monde ! Je remercie Léa, Marta, Manon, Naiara, Sara, Lucie, Salma, Boram, Loréna, Aurélie, Claire, Marie, Maozhe, Elisabeth, Carole, Bruno, Maxime, Ruben, Julien Bollon, Julien Couvidat, Baptiste, Daoud, Yoann, Valérie, Corinne, Hélène, Vincent, Mathieu, Denise, Fanny, Gaëlle, Jacques, Patrick, Agnès, Frédérique.

J'ai apprécié beaucoup les moments passés ensemble à déjeuner, ceux des pauses de tous les jours, de la K-fet, de K-Box, ceux des goûters, des fêtes, des pique-niques, de l'escalade, du tennis, du ski, du patinage, du jogging, du hockey subaquatique, etc., pendant lesquels vous m'avez montré des styles de vie différents et vous m'avez aussi appris plein de mots et expressions, bons ou pas très bons. Je suis très contente d'avoir pu me faire des amis internationaux. J'ai ouvert des horizons nouveaux en parlant avec vous. Pour cela, je vous remercie beaucoup.

Je tiens à remercier tous mes stagiaires, Yiou Chen, Thibaut, Tianyi Huang, Yue Tian, Hamida, Joanny. Sans vous, je n'aurais jamais fini mes manip. Je vous remercie beaucoup !

Enfin, je remercie mes parents, ma familles, mes amis, merci beaucoup pour vos soutiens et vos encouragements ! Je remercie Yingying Wang, Xuejiao Jiang, Min Ji, Xunqian Yin, Bijin Xiong, Xiaoqin Lei, Zhaowu Zhan, Lei Han, Shengfu Li, Liang Yu, Jianeng Tan, Xibo Yan.

Je chérirai toujours la mémoire de ma vie au labo, à l'INSA et à Lyon, j'espère que vous aurez l'occasion de voyager en Chine où j'aurai alors le plaisir de vous servir de guide ! Je vous laisse mon email adresse : liuxuninsa@163.com pour me contacter.

Publications en revues à comité de lecture

Liu, X. ; Bayard, R. ; Benbelkacem, H. ; Buffiere, P. & Gourdon, R. (2014). Évaluation du potentiel biométhanogène de biomasses lignocellulosiques. *Déchets, Sciences et Techniques*, N°67, p. 36-49.

Liu, X. ; Bayard, R. ; Benbelkacem, H. ; Buffiere, P. & Gourdon, R. (2015). Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics. *Biomass and Bioenergy* (81) : 534-543.

Bayard, R. ; Liu, X. ; Benbelkacem, H. ; Buffiere, P. ; & Gourdon, R. (2015). Evaluation of the biochemical methane potential of lignocellulosic residual biomasses. *Waste Management* (**soumise pour publication en novembre 2015**).

Liu, X. ; Hiligsmann, S. ; Bayard, R. ; & Gourdon, R. (2015). Anaerobic digestion of different lignocellulosic biomass pretreated with *Ceriporiopsis subvermispora*.

Bayard, R. ; Liu, X. ; de Brauer, C. Benbelkacem, H. ; & Gourdon, R. (2015). Chemical and structural characterization of lignocellulosic biomass after pretreatment with *Ceriporopsis subvermispora* prior to anaerobic digestion.

Communications orales

Liu X., Bayard R., Benbelkacem H., Buffière P. & R. Gourdon (2014). Complementary methods for the evaluation of anaerobic biodegradability of lignocellulosic biomass. 2nd International Conference on Sustainable Solid Waste Management. 12th – 14th June 2014, Athens, Greece. (**communication orale**).

Liu X., Bayard R. & R. Gourdon (2014). Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass pretreated with *Ceriporiopsis subvermispora*. Proceedings Venice 2014, Fifth International Symposium on Energy from Biomass and Waste. San Servolo, Venice, Italy; 17-20 November 2014. (**communication orale**).

SOMMAIRE

Remerciements	6
Liste des abréviations.....	15
Liste des figures	16
Liste des tableaux	18
Introduction générale.....	19
I. Introduction.....	21
II. Ressources et production de biogaz.....	23
II.1. Quels gisements ?	23
II.2. Déchets ménagers et assimilés.....	24
II.3. Résidus agricoles et agro-alimentaires	25
II.3.1. Résidus d'élevage.....	25
II.3.2. Résidus de culture.....	26
II.4. Résidus sylvicoles.....	27
II.5. Conclusions	29
III. Caractéristiques des biomasses lignocellulosiques.....	30
III.1. Généralités.....	30
III.2. Composés extrapariétaux	30
III.3. Le polysaccharide majoritaire, la cellulose	30
III.4. Les hémicelluloses	32
III.5. La lignine.....	35
III.6. Composition des biomasses lignocellulosiques.....	37
III.7. Structure des biomasses lignocellulosiques.....	40
IV. Méthanisation de biomasses lignocellulosiques.....	43
IV.1. Généralités sur la méthanisation	43
IV.1.1. Principe	43
IV.1.2. Hydrolyse.....	44
IV.1.3. Acidogenèse.....	44
IV.1.4. Acétogenèse	45
IV.1.5. Méthanogenèse	45

IV.2. Biodégradabilité anaérobie des biomasses lignocellulosiques	46
IV.2.1. Principe	46
IV.2.2. Cellulose	46
IV.2.3. Hémicelluloses	47
IV.2.4. Lignine	47
IV.2.5. Accessibilité des polymères	48
IV.3. Prétraitements et méthanisation	48
IV.3.1. Prétraitement mécanique	49
IV.3.2. Prétraitements thermiques / thermochimiques	49
IV.3.3. Prétraitement acide	50
IV.3.4. Prétraitement alcalin	50
IV.3.5. Prétraitement oxydant	50
V. Prétraitements fongiques et délignification.....	51
V.1. Les champignons lignocellulolytiques	51
V.1.1. Les champignons de pourriture brune et de pourriture molle	51
V.1.2. Les champignons de pourriture blanche	52
V.2. Mécanismes de délignification par les champignons de pourriture blanche	56
V.2.1. Généralités.....	56
V.2.2. Les enzymes extracellulaires de la délignification	57
V.2.3. Autres mécanismes de délignification.....	62
V.3. Métabolisme de <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	63
V.3.1. Généralités.....	63
V.3.2. Utilisation de <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> pour le prétraitement de biomasses lignocellulosiques.....	64
VI. Conclusions et organisation du plan expérimental.....	66
I. Biomasses sélectionnées.....	69
II. Prétraitements fongiques.....	73
II.1. Préculture des fonges et conditions d'ensemencement.....	73
II.2. Conditions de prétraitement.....	73
III. Caractérisation des substrats.....	75

III.1. Analyses globales de la matière organique	75
III.1.1. Teneur en matière sèche et matières volatiles	75
III.1.2. Mesure de la demande chimique en oxygène.....	75
III.1.3. Mesure du CT, CIT et COT et analyse élémentaire	75
III.1.4. Comportement à la lixiviation.....	76
III.2. Caractérisation biochimique de la matière organique	76
III.2.1. Analyse des fibres, procédure van Soest	77
III.2.2. Protocole NREL	78
III.2.3. Caractérisation de la lignine par thioacidolyse	80
III.3. Caractérisations spectrales et thermogravimétrique de la matière organique	81
III.3.1. Analyse IRTF	81
III.3.2. Analyse calorimétrique différentielle et thermogravimétrique couplées	81
IV. Evaluation de la biodégradabilité de biomasses lignocellulosiques.....	84
IV.1. Accessibilité enzymatique de la cellulose	84
IV.1.1. Principe	84
IV.1.2. Mode opératoire et exploitation des résultats.....	84
IV.2. Demande biologique en oxygène sur solide.....	84
IV.2.1. Principe	84
IV.2.2. Mode opératoire	85
IV.2.3. Expression des résultats	85
IV.3. Potentiel de production de biogaz	85
IV.3.1. Principe	85
IV.3.2. Mode opératoire	85
IV.3.3. Expression des résultats	87
V. Mesures d'activités enzymatiques.....	88
V.1. Conditions d'extraction	88
V.2. Mesure de l'activité Manganèse Peroxydase.....	88
V.3. Mesure de l'activité Laccase	89
V.4. Mesure de l'activité Cellulase	89

V.5. Mesure de l'activité β -glucosidase	90
VI. Can BioMethane Potential (BMP) be predicted from other variables such as biochemical composition in lignocellulosic biomass and related organic residues?	92
VI.1. Abstract	92
VI.2. Introduction	94
VI.3. Material and methods	95
VI.3.1. Nature, origin and preparation of samples	95
VI.3.2. Total and easily-soluble organic matter contents	99
VI.3.3. Biochemical composition	99
VI.3.4. Determination of biodegradability	100
VI.3.5. Statistical analysis of data	101
VI.4. Results and discussion	102
VI.4.1. General overview of the composition and characteristics of the substrates	102
VI.4.2. Prediction of BioMethane Potential	108
VI.5. Conclusion	113
VI.6. References	113
VII. Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics	117
VII.1. Abstract	117
VII.2. Introduction	119
VII.3. Materials and Methods	120
VII.3.1. Collection and preparation of biomass substrates	120
VII.3.2. Global analytical parameters	123
VII.3.3. Organic matter characterization	123
VII.3.4. Biodegradation measurements	125
VII.3.5. Enzymatic hydrolysis	126
VII.3.6. Statistical analysis of experimental data	127
VII.4. Results and discussion	127
VII.4.1. Analytical results and general correlation using PCA	127
VII.4.2. Correlation between biochemical methane potential (BMP) and other variables	132

VII.5. Conclusions.....	139
VII.6. References.....	140
VIII. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomasses pretreated by <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	144
VIII.1. Abstract	144
VIII.2. Introduction	145
VIII.3. Materials and Methods	147
VIII.3.1. Raw materials	147
VIII.3.2. Fungus and inoculum preparation	147
VIII.3.3. Enzyme extraction and assays	148
VIII.3.4. Determination of components of the substrates	148
VIII.3.5. Enzymatic hydrolysis	149
VIII.3.6. Biochemical methane potential	149
VIII.4. Results and discussion.....	150
VIII.4.1. Effect of fungi F1 and F2 on biomass composition after 28 d incubation	150
VIII.4.2. Enzyme production	155
VIII.4.3. Enzymatic hydrolysis and BMP	159
VIII.5. Conclusion.....	167
VIII.6. References	167
VIII.7. Supplementary Tables and Figures.....	172
VIII.7.1. Effect of autoclave sterilization and 28 d aqueous incubation on different biomass samples.....	172
VIII.7.2. Effect of sulfuric acid hydrolysis and autoclave sterilization on different carbohydrates	176
IX. Fungal pretreatment effects on chemical and structural characteristics of lignocellulosic biomass pretreated with <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>.....	179
IX.1. Abstract	181
IX.2. Introduction	182
IX.3. Materials and Methods.....	183
IX.3.1. Collection and preparation of biomass substrates	183
IX.3.2. Fungi, inoculum preparation and solid-state fermentation of biomass	184

IX.3.3. Biochemical analysis	185
IX.3.4. Organic matter content.....	185
IX.3.5. Biochemical methane potentials (BMP)	185
IX.3.6. Enzymatic hydrolysis.....	186
IX.3.7. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).....	186
IX.3.8. Thermal analyses	188
IX.3.9. Statistical analysis of experimental data	188
IX.4. Results and discussion.....	189
IX.4.1. Determination of biochemical components of five biomasses	189
IX.4.2. FTIR.....	193
IX.4.3. TG-DSC measurements	205
IX.4.4. Analytical results and general correlation using PCA	219
IX.5. Conclusion	221
IX.6. References	222
X. Conclusions générales et Perspectives	231
X.1. Conclusions générales	231
X.2. Perspectives	231

Liste des abréviations

ACD : Analyse Calorimétrique Différentielle

ACD : Analyse Calorimétrique Différentielle (en anglais DSC : Differential Scanning Calorimetry)

ADF: Acid Detergent Fiber

ADL : Acid Detergent Lignin

ATCC : American Type Culture Collection

ATG : Analyse ThermoGravimétrique

ATG/TG : Analyse ThermoGravimétrique

BMP : Biométhane Potentiel

CLHP : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

COT : Carbone Organique Total

IRFT : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (en anglais FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy)

MO : Matière Organique

MO : Matière Organique

MODECOM : Méthode de caractérisation des ordures ménagères

MS : Matière Sèche

MS : Matière Sèche

MV : Matière Volatile

MV : Matière Volatile

NDF: Neutral Detergent Fiber

NREL : Laboratoire National des Energies Renouvelables (National Renewable Energy Laboratory)

WO : Wood Waste, Déchets Bois

Liste des figures

Figure 1 : Structure du polymère de cellulose d'après Harmsen (2010).	31
Figure 2 : Organisation tridimensionnelle du polymère de cellulose d'après Harmsen (2010).	31
Figure 3 : Maille cristalline de la cellulose.	32
Figure 4 : O-Acetyl4-O-methyl- D-glucuronoxylane des angiospermes d'après Dekker (1985).	33
Figure 5 : Arabino-4-O-methylglucuronoxylane des gymnospermes d'après Dekker (1985).	34
Figure 6 : Glucomannane des angiospermes d'après Dekker (1985).	34
Figure 7 : O-Acetylgalactoglucomannane des gymnospermes d'après Dekker (1985).	34
Figure 8 : Structure des 3 monolignols précurseurs des unités p-hydroxyphényles H, guaiacyles G et syringyles S constitutives des lignines d'angiospermes. Les numéros ou codes des carbones aromatiques et des carbones de la chaîne propane sont représentés pour un des monolignols.	35
Figure 9 : Principaux types de modes de liaisons interunités dans les lignines (R1 et R2 = H ou OCH ₃), avec leur nomenclature usuelle (adapté de Lapierre 2010).(Lapierre, 2010)	36
Figure 10 : Mode d'association des lignines, des arabinoxyanes et des esters p-coumariques (PC) et féruliques (FE) dans les parois secondaires de graminées. Avant lignification (au dessus de la flèche), les arabinoxyanes de graminées sont acylés surtout par FE (et un peu par PC). Au cours de la lignification, les esters féruliques peuvent être oxydés en radicaux et se coupler à un radical d'alcool coniférylique pour former l'amorce de lignification (entourée de tirets). La lignification se poursuit sur cette amorce avec couplage d'autres radicaux, dont celui issu de l'alcool sinapylique p-coumaroylé, ce qui génère la formation d'une unité S acylée par PC (Figure communiquée par C. Lapierre).	37
Figure 11 : Structuration des microfibrilles et macrofibrilles dans les cellules végétales.	40
Figure 12 : Modèle d'organisation du complexe lignocellulosique d'après Fengel & Wegner, 1984 in Shleser, 1994.	41
Figure 13 : Représentation simplifiée des étapes de biodégradation anaérobie de la matière organique des déchets de biomasse.	44
Figure 14 : Dégradation de lignine par champignons de pourriture blanche du phylum Basidiomycète. Schéma adapté de (Dashtban et al., 2010).	57
Figure 15 : Oxydation de groupes phénoliques par laccase (Archibald et al., 1997; Higuchi, 1989).	59
Figure 16 : Oxydation de groupes non-phénolique par laccase et ABTS (Archibald et al., 1997; Bourbonnais & Paice, 1990).	59
Figure 17. Oxydation du composé modèle non-phénolique-O-4 de lignine catalysée par LiP d'après Wong et al (2009).	60

Figure 18 : Oxydation catalysée par MnP du composé de modèle phénolique de l'éther aryglycerol-aryle de la lignine d'après Wong (2009).	61
Figure 19 : Cycle catalytique de la peroxydase du manganèse (MnP) et la formation de radicaux par le système de la peroxydase du manganèse en présence de différents substrats d'après Hofrichte (2002).	61
Figure 20 : Plan expérimental	67
Figure 22 : Procédure de réalisation des essais d'incubations sur matrices « témoins » T (stérilisées) et matricesensemencées (stérilisées et inoculées).	74
Figure 23 : Fractionnement biochimique en SOL, HEM, CELL et RES d'après la procédure modifiée de van Soest décrite dans la norme XP U44-162 (2005).	77
Figure 24 : Principe de l'évaluation des unités de lignines liées seulement par des liaisons β -O-4 par thioacidolyse. Les unités p-hydroxyphényles H ($R_1=R_2=H$), guaiacyles G ($R_1=OMe$; $R_2=H$) et syringyles S ($R_1=R_2=OMe$) engagées seulement dans des liaisons β -O-4 donnent spécifiquement des monomères thioéthylés H, G et S lors de la thioacidolyse.	80
Figure 25 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique.	244
Figure 26 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique contenant que la courbe TG et DTG.	245
Figure 27 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique et interprétation des variations de masse.	245
Figure 28 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique - courbe ACD et DTG.	245
Figure 29 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique et intégration des pics ACD.	246
Figure 30 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique pour définir le Pic 1 et le Pic 2 utilisés pour les données thermiques.	247

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des différents gisements de biomasses lignocellulosiques.	23
Tableau 2 : Potentiels méthanogènes de déchets ménagers et assimilés (rapportés en Matières Volatiles).	25
Tableau 3 : Déjections animales récupérées en France (en Mt par an), d'après l'étude Biomasse Normandie, 2002, citée par IFEN, 2005.	26
Tableau 4 : Potentiels méthanogènes de différents types de déjections animales (m^3CH_4/kg_{MV})	26
Tableau 5 : Potentiels méthanogènes des résidus des cultures.	27
Tableau 6 : Catégories de résidus forestiers (% des volumes produits) (EDF, 2006).	28
Tableau 7 : Composition de biomasses lignocellulosique	38
Tableau 8 : Présentation des principales liaisons chimiques du complexe lignocellulosique d'après Faulon et al. (1994).	42
Tableau 9 : Effets du prétraitement de biomasses lignocellulosique par des champignons de pourriture blanche.	53
Tableau 10 : Caractéristiques des principaux groupes des enzymes ligninolytiques fongiques (d'après Dashtban et al., 2010).	58
Tableau 11 : Mécanismes et enzymes impliquées dans la production de $\bullet OH$ chez différentes espèces fongiques	63
Tableau 12 :	64
Tableau 13 : Origine des biomasses sélectionnées.	70
Tableau 14 : Conditions opératoires utilisées pour l'analyse thermogravimétrique des échantillons.	83
Tableau 15. Facteur de correction des concentrations en sucres mesurées après hydrolyse chimique.	242
Tableau 17 : Données et paramètres thermiques définis.	246

Introduction générale

Face à la raréfaction des ressources énergétiques fossiles et aux enjeux du réchauffement climatique, la biomasse apparaît comme une ressource crédible de carbone renouvelable susceptible d'être mobilisée et valorisée comme alternative aux énergies fossiles pour la production de combustibles solides, mais également pour la synthèse de carburants (liquides ou gazeux). La production de méthane par digestion biologique anaérobie de biomasse est considérée comme l'une des filières d'avenir pour contribuer à réduire notre dépendance vis-à-vis des énergies fossiles. Le méthane est un vecteur énergétique qui présente l'avantage de pouvoir être produit à partir de résidus organiques et utilisé en tant que substituant du gaz naturel.

Dans la recherche de ressources énergétiques renouvelables, la bioconversion en méthane de biomasses lignocellulosiques est l'une des alternatives les plus prometteuses. Parmi les biomasses lignocellulosiques, les résidues agricoles et sylvicoles sont notamment susceptibles d'être mobilisés. Toutefois, les biomasses lignocellulosiques sont peu biodégradables. De plus, les biomasses lignocellulosiques différentes ont les caractéristiques bio-physico-chimiques très variables en raison des compositions et des structurales diverses. Donc, l'influence des caractéristiques bio-physico-chimiques des biomasses lignocellulosiques sur le potentiel de biométhane ainsi que les corrélations entre eux deviennent l'enjeu important.

Les biomasses lignocellulosiques sont principalement composées de la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Vu que la lignine est difficile biodégradable et donc, elle est l'obstacle principal pendant le processus de digestion anaérobie. Cela nécessite de prétraiter les biomasses lignocellulosiques avant de la bioconversion en méthane pour améliorer la production de méthane. Parmi les méthodes physiques, chimiques and biologiques, le prétraitement fongique par le champignon de pourriture blanche est une des plus écologiques et des moins apportant post-traitements des substances de pollution. Le champignon de pourriture blanche *Ceriporiopsis subvermispora* est considéré comme un des plus efficaces champignons de dégrader la lignine en laissant la cellulose au maximum qui est l'origine important de produire le méthane. En outre, la taille de particule de biomasse lignocellulosique est aussi un facteur important en influençant la performance de prétraitement fongique. Malgré de nombreuses études ont été mis en oeuvre, cependant, les comportements du champignon et les changements de biomasse au cours de prétraitement fongique ne sont pas réguliers et restent encore obscurs.

L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer l'influence des caractéristiques d'une large gamme de substrats lignocellulosiques sur leur biodégradabilité anaérobie et les corrélations entre les caractéristiques bio-physico-chimiques et le potentiel de biométhane, et d'étudier les effets de prétraitement fongique avec *Ceriporiopsis subvermispora* sur le potentiel de biométhane des biomasses lignocellulosiques sélectionnées dans la présent étude et de caractériser leurs changements avant et après le prétraitement fongique.

A. Synthèse bibliographique

I. Introduction

Face à l'épuisement des ressources énergétiques fossiles et aux enjeux environnementaux et socio-économiques liés à leur consommation, la biomasse apparaît comme une ressource renouvelable susceptible d'être mobilisée et valorisée comme alternative aux énergies fossiles pour la production de combustibles solides, mais également pour la synthèse de carburants (liquides ou gazeux). La production de méthane par digestion biologique anaérobie de biomasse lignocellulosique est considérée comme l'une des filières d'avenir pour contribuer à réduire notre dépendance vis-à-vis des énergies fossiles (Frigon & Guiot, 2010). Le méthane est un vecteur énergétique qui présente l'avantage de pouvoir être produit à partir de résidus organiques et utilisé en tant que substituant du gaz naturel. La production d'énergie primaire en Europe à partir du biogaz a été de 13,6 MTEP (Tonne Equivalent Pétrole) en 2012 (0,41 MTEP en France), dont 68% issues des centres de stockage, 19% de la digestion des boues d'épuration et 13% d'autres filières telles que la digestion d'effluents, et la méthanisation de déchets ménagers ou agricoles (Observ'ER, 2013).

Parmi les résidus organiques « éligibles » pour la production de biogaz, il existe de nombreux gisements susceptibles d'être mobilisés notamment les déchets agricoles et les déchets verts, les boues de station d'épuration, la fraction organique des déchets ménagers, les déchets de restauration, les déchets de la sylviculture et les déchets des industries agro-alimentaires (Buffière et al. 2009) (RECORD, 2009). L'évaluation de ces gisements à l'échelle européenne en termes de quantité et de disponibilité est encore assez mal maîtrisée (Bidlingmaier et al., 2004). L'éligibilité de ces gisements dépend entre autres de leurs propriétés bio-physico-chimiques. La structure des matériaux, la présence de matériaux indésirables, la composition biochimique et la biodégradabilité anaérobie (potentiel biométhanogène) sont sources de limitations techniques à la conversion en biogaz de la biomasse. En effet, tous les résidus organiques n'ont pas le même potentiel de production de méthane. Celui-ci dépend de leurs propriétés structurales (taille des particules, hétérogénéité, capacité de rétention en eau) et biochimiques (fraction soluble, hémicellulose, cellulose, lignine et fractions synthétiques). Des opérations de prétraitement s'avèrent souvent nécessaires afin de favoriser l'expression du potentiel méthanogène et d'optimiser le fonctionnement des digesteurs.

L'un des verrous à la valorisation par digestion anaérobie de la majeure partie des résidus organiques est la structure lignocellulosique prédominante dans certains résidus. Cette structure complexe associe étroitement trois polymères liés : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. La cellulose et les hémicelluloses sont des polysaccharides tandis que la lignine est un polymère aromatique. Ces trois constituants sont présents en proportions variables selon l'origine de la matière considérée. Les longues chaînes polysaccharidiques de cellulose sont organisées sous la forme de microfibrilles réunies entre elles par les polymères d'hémicellulose, l'ensemble étant intégré dans le réseau réticulé de la lignine. Ainsi, la lignine constitue un squelette tridimensionnel qui protège la cellulose et les hémicelluloses. La présence de lignine conduit à réduire le potentiel biométhanogène du substrat et à diminuer la vitesse de production de biogaz.

Les travaux de recherche publiés sur le prétraitement de biomasses lignocellulosiques à des fins de valorisation énergétique ont été principalement orientés vers la production d'éthanol dit de seconde génération par fermentation. Les études de prétraitement en vue de la production de biométhane sont

plus rares. En tout état de cause, les mécanismes de destruction des matrices et leur influence sur l'accessibilité des polymères à l'hydrolyse restent encore mal connus. Par ailleurs, la consommation élevée d'énergie et l'usage d'agents chimiques (acides, bases, solvants) nécessaires pour la déstructuration justifient le développement de techniques alternatives permettant de réduire les coûts et de minimiser les impacts environnementaux.

Les prétraitements fongiques et enzymatiques sont attractifs sur ces critères car peu énergivores et nécessitant des conditions opératoires raisonnables en termes de consommation de réactifs. Ces techniques sont basées sur les propriétés hydrolytiques de nombreuses espèces fongiques, qui se caractérisent par un large spectre enzymatique leur conférant la capacité d'hydrolyser les polymères constitutifs de la biomasse lignocellulosique.

L'objectif de la revue bibliographique est de fournir un état de l'art de la recherche dans le domaine développé en quatre parties. La première partie porte sur la présentation des gisements de biomasses lignocellulosiques, et de leur potentiel biométhanogène. La deuxième partie décrit les caractéristiques des biomasses lignocellulosiques et la troisième est consacrée aux prétraitements bio-physico-chimiques susceptibles d'être mis en œuvre pour favoriser la bioconversion de biomasses lignocellulosiques en méthane. La dernière partie présente l'état de l'art des connaissances sur les prétraitements fongiques de biomasses lignocellulosiques. Les objectifs et l'organisation de la thèse sont ensuite présentés sur la base des conclusions de la synthèse bibliographique.

II. Ressources et production de biogaz

II.1. Quels gisements ?

Les ressources de résidus lignocellulosiques sont généralement répertoriées selon les secteurs économiques qui les produisent, tels que l'agriculture, la sylviculture, l'industrie agro-alimentaire ou la consommation des ménages (Tableau 1). Malgré les récentes études, les estimations de la production européenne de résidus lignocellulosiques sont encore peu précises.

Tableau 1 : Récapitulatif des différents gisements de biomasses lignocellulosiques.

Catégories	Origines	Ressources
Déchets ménagers et assimilés		
Fraction organique des déchets ménagers	Déchets domestiques	Biodéchets alimentaires (principalement d'origine végétale)
Déchets celluloseux	Déchets domestiques et d'activités professionnelles	Déchets d'emballage en papiers ou carton Papiers (journaux, magazines, papier de bureau)
Déchets verts	Particuliers et élagages de collectivités	Houppiers, branchages, souches, feuilles...
Résidus agricoles		
Résidus de l'élevage	Activités agricoles	Lisiers et fumiers
Résidus de culture	Activités agricoles	Parties des plantes laissées non cultivées et laissées sur place : pailles, cannes...
Résidus de l'industrie agro-alimentaire		
Déchets de transformation de produits agricoles	Industries de transformation agroalimentaires	Mélasses, pulpes, marcs, coques...
Déchets de fabrication de produits alimentaires	Industries de transformation agroalimentaires	Déchets de production
Résidus sylvicoles		
Résidus d'exploitation forestière	Activités d'abatages	Tout le bois coupé et laissé sur place : houppiers, branchages, souches
Déchets de l'industrie du bois	Industrie de première transformation de bois	Ecorces, sciures, chutes de bois
	Industrie de seconde transformation de bois	Sciures, chutes de bois, copeaux d'usinage, poussières de ponçage

Les sources disponibles sur les gisements de biomasse, ou sur les données nécessaires à l'estimation de ces gisements, sont de plusieurs ordres. Les données de cadrage, disponibles au niveau national, sont issues d'inventaires. Ces données sont rassemblées et harmonisées afin d'être comparables dans

les bases de données mondiales (FAOSTAT, FORESTAT) ou européennes (EUROSTAT). Ces bases de données fournissent des informations générales sur les ressources agricoles et forestières (productions alimentaires, volumes d'abattages...) mais restent incomplètes ou estimatives en ce qui concerne l'évaluation des résidus issus de ces activités. Les paragraphes suivants rassemblent les informations collectées provenant d'études françaises sur les gisements français des différentes catégories de résidus lignocellulosiques.

II.2. Déchets ménagers et assimilés

Parmi les déchets ménagers et assimilés (DMA), seule la partie fermentescible est apte à la production de biogaz. En Europe, la production de déchets ménagers fermentescibles est évaluée à 200 Mt (Bidlingmaier et al., 2004). Selon les éléments de composition moyenne donnés par Davidsson et coll. (2007) (Davidsson et al., 2007), le potentiel récupérable sous forme de biogaz serait proche de 18 MTEP. En France en 2010, la production de déchets ménagers et assimilés a représenté 37,8 Mt dont 29,5 Mt (78%) de déchets domestiques collectés par le service public (ADEME, 2014). Près de 15 Mt de déchets bénéficient d'une collecte séparée (déchets d'emballages et encombrants). Sur le tonnage global collecté par le service public, 20,2 Mt sont constitués de matière organique, dont 6,8 Mt de déchets de cuisine, 7,5 Mt de papiers-cartons et textiles sanitaires et 5,9 Mt de déchets verts. 5,7 Mt de déchets organiques, non collectés, seraient en gestion domestiques (compostage individuel).

L'interdiction d'enfouir les déchets organiques biodégradables depuis 2015 et les incitations à la valorisation des DMA ont favorisé le développement de la filière de méthanisation des fractions organiques séparées et des ordures ménagères résiduelle (OMR). En France, elle ne représentait en 2004 que 1% du flux, mais ce chiffre a augmenté suite à la mise en service d'une dizaine de centres de méthanisation en 2010, assurant le traitement de 0,47 MT/an, et correspondant à la production de 820 GWh thermique et 109 GWh électrique, en tenant compte la valorisation énergétique du biogaz issu des boues de station d'épuration et de la méthanisation des IAA et déchets ménagers (ADEME, 2014). En Europe, les installations de méthanisation d'ordures ménagères mixtes ou résiduelles constituent près de la moitié du parc européen des installations de méthanisation d'ordures ménagères, qui est estimé en 2006 à 4 Mt/an (De Baere, 2006).

Principalement constitués de tontes de gazon, tailles d'arbustes, branchages et feuilles mortes, les **déchets verts** sont issus des activités collectives de l'entretien des espaces verts publiques et de l'activité domestique de l'entretien des jardins, avec collecte par apport volontaire en déchetteries. Collectés séparément des autres DMA, ils sont uniquement constitués de biomasse et sont donc parfaitement adaptés à un traitement biologique, bien que leur teneur parfois élevée en lignine puisse limiter leur biodégradabilité. Ils représentent un gisement de 5,9 Mt/an (ADEME, 2014). Depuis le milieu des années 1990, le compostage de déchets verts s'est très fortement développé, représentant en 2012 plus de 90% des déchets verts traités.

La production de méthane à partir de déchets ménagers dépend de leur composition et de leur provenance, mais également du mode de collecte (*cf.* Tableau 2) : les ordures ménagères résiduelles contiennent encore beaucoup d'éléments faiblement biodégradables (plastiques, bois), et ont donc un potentiel énergétique plus faible (en terme de méthanisation) que les déchets fermentescibles. Signalons également que le tri mécanique des biodéchets ne permet pas vraiment d'en séparer la fraction la plus biodégradable (Mace et al., 2003).

Tableau 2 : Potentiels méthanogènes de déchets ménagers et assimilés (rapportés en Matières Volatiles).

	Potentiel méthanogène $\text{m}^3\text{CH}_4/\text{kg}_{\text{MV}}$	Référence
Papier bureau	0,37	(Owens & Chynoweth, 1993)
Carton	0,34	(Owens & Chynoweth, 1993)
Déchets de cuisine	0,54	(Chynoweth et al., 1993)
Ordures ménagères brutes	0,2 – 0,24	(Chynoweth et al., 1993)
Ordures ménagères résiduelles	0,15 – 0,2	(Buffière et al., 2008)
Biodéchets (collecte sélective ou tri manuel)	0,36 – 0,4	(Mace et al., 2003)
Biodéchets (tri mécanique)	0,23 – 0,26	(Mace et al., 2003)

II.3. Résidus agricoles et agro-alimentaires

Avec une production annuelle estimée à près de 1000 Mt en Europe (Bidlemaier et al., 2004), les résidus issus du secteur agricole représentent un fort potentiel de production de biogaz. Ils font l'objet du développement de la filière méthanisation en Europe, en particulier dans les pays du nord comme l'Allemagne où environ 5000 installations de « méthanisation à la ferme » sont actuellement répertoriées. On distingue généralement les résidus de l'élevage (déjections animales) et les résidus de culture. Avec une production estimée à 375 millions de tonnes par an en France, l'agriculture s'affiche comme le premier secteur économique producteur de déchets. De l'ordre de 45 Mt de déchets des industries agroalimentaires sont générées annuellement en France (Bayard & Gourdon, 2010).

II.3.1. Résidus d'élevage

Les principaux résidus de l'élevage sont les lisiers et les fumiers et les fientes. Les lisiers sont des mélanges de fèces, d'urine, avec parfois des résidus de litière, des eaux de lavage, des résidus d'aliments. Les fumiers sont des mélanges de fèces et d'urine avec une quantité importante de litière. Les pratiques d'élevage d'aujourd'hui sont majoritairement basées sur la stabulation, c'est-à-dire l'élevage des animaux dans un bâtiment ou dans un parc clos : 80% des bovins sont élevés sur litières (production de fumier), 100% des veaux et 90% des porcs sont élevés hors-sol sans litière (production de lisiers) (Whitwham, 1999). Par conséquent, les conditions d'élevage conduisent à générer des résidus potentiellement mobilisables pour la méthanisation, en particulier dans les régions où il existe une production excédentaire qui rend difficile le recourt systématique à l'épandage sur les terres agricoles (Védrenne, 2007). La production globale annuelle de résidus d'élevage est estimée à près de 280 millions de tonnes de matières humides, avec environ un tiers collecté (cf. Tableau 3) et les deux autres tiers correspondant aux déjections émises directement dans les champs lors du pâturage des bovins. Toutefois, de nombreux facteurs sont à prendre en considération pour tenir compte de la variabilité des caractéristiques de ces ressources, comme par exemple la teneur en humidité, variable selon les conditions d'élevages et les espèces animales considérées ; les conditions d'alimentation ; l'exploitation agricole ; etc. (Buffière et al. 2009). Le Tableau 3 reporte malgré tout quelques potentiels biométhanogènes de déjections animales, correspondant aux gammes de valeurs citées dans la littérature.

Tableau 3 : Déjections animales récupérées en France (en Mt par an), d'après l'étude Biomasse Normandie, 2002, citée par IFEN, 2005.

	Fumiers	Lisiers
Bovins	89	19
Porcins	6	19
Avicoles et Cunicoles	3	6
Ovins et caprins	8	0
Total	106	44

Tableau 4 : Potentiels méthanogènes de différents types de déjections animales ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{kg}_{\text{MV}}$)

	Fumiers	Lisiers
Bovins	0,15-0,45	0,15-0,3
Porcins	0,15-0,2	0,25-0,4
Avicoles	ND	0,3-0,5
Cunicoles	0,15-0,3	0,2-0,3
Ovins et caprins	0,2-0,3	ND

II.3.2. Résidus de culture

Les résidus de cultures correspondent à la partie des plantes cultivées qui ne présentent pas de valeur nutritive pour l'homme. Ce sont principalement constitués des pailles et de cannes de culture céréalières (blé, orge, avoine, seigle, riz, triticale) et oléagineuses (tournesol et colza), et de sarments de vignes. Les déchets sont partiellement laissés au champ en tant que structurant et amendement organique, ce qui rend délicat l'estimation de la production brute de déchets de cultures. La production de résidus de culture est estimée de l'ordre de 50 Mt/an de matière humide (Bayard et Gourdon, 2010).

- La filière céréalière produit des **pailles** issues des cultures de graminées. La paille correspond à la tige lignifiée de la plante récoltée à maturité. La production de paille en France est de l'ordre de 22 Mt/an de matière humide, majoritairement produite à partir des cultures du blé tendre et d'orge, respectivement à 70 et 20% de la production céréalière dans l'hexagone (RECORD n°08-0231/1A, 2010). D'après cette source documentaire, 16,5 Mt/an sont collectés et très majoritairement utilisés comme litière pour les animaux élevés en stabulation. Seulement 5,5 Mt/an seraient ainsi laissés sur les sols agricoles, correspondant à un taux de retour au sol inférieur au taux moyen conseillé (Whitwham, 1999).
- Les filières maïs et tournesol produisent les **cannes**, résidus de culture abandonnés sur le sol après le passage de la moissonneuse batteuse. Elles sont constituées de la tige, des feuilles et des spathes de la plante récoltée lorsque les grains sont à maturité. Elle se compose en moyenne de 50% de tiges, 22% de feuilles, 15% d'épis et 13% d'enveloppes. Les cannes sont en général broyées après battage ;
- La filière betteravière produit des **herbes** et **radicelles** (0,9 à 1,8 Mt/an), des **mélasses** (0,9 Mt/an), des **pulpes**, des écumes et des vinasses ;
- La filière vitivinicole produit des marcs de raisin épuisés (0,91 millions de tonnes par an) et des vinasses (de marcs, de lies, de vin).

Les déchets de culture sont relativement secs (taux de MS de l'ordre de 80 % en masse, voire supérieur), riches en lignocellulose, et pauvres en azote (0,5 à 0,8 %_{MS}) se prêtent mal à un traitement biologique tels qu'ils sont, mais peuvent être traités en mélange avec des déchets plus humides, notamment d'origine animale (cas typique des lisiers). Toutefois, de nombreuses études de méthanisation de ces composés ont été publiées et permettent d'avoir une bonne estimation de leur aptitude à la production de biogaz (*cf.* Tableau 5). De nombreux articles sont disponibles pour compléter ces données, notamment de Chynoweth (Chynoweth et al., 1993; Chynoweth et al., 2001; Owens & Chynoweth, 1993), de Gunaseelan (2004), ou plus récemment de Ward et al. (2008).

Tableau 5 : Potentiels méthanogènes des résidus des cultures.

	MS%_{MH}	MV %_{MS}	PBM¹	Référence
Herbe (gazon)	37,0%	88,1%	0,209	(Owens & Chynoweth, 1993)
Herbe (gazon)	92,4%	85,1%	0,258	(Veeken & Hamelers, 1999)
Herbe (fourrages)	88,2%	95,8%	0,291	(Tong et al., 1990)
Paille de blé	94,9%	94,8%	0,203	(Veeken & Hamelers, 1999)
	ND	ND	0,210	(Chandler et al., 1980)
Paille de blé	93,5%	91,3%	0,302	(Tong et al., 1990)
Paille de blé	92,8%	90,6%	0,333	(Tong et al., 1990)
Paille de blé	8,4%	86,0%	0,304	(Hashimoto, 1986)
Paille de blé	8,7%	86,1%	0,318	(Hashimoto, 1986)
Paille de maïs	89,6%	93,2%	0,36	(Tong et al., 1990)
Rafle de maïs	ND	ND	0,275	(Chandler et al., 1980)
Feuilles de maïs	ND	ND	0,255	(Chandler et al., 1980)
Paille de riz	92,1%	86,3%	0,200	(Zhang & Zhang, 1999)
Paille de riz	91,0%	89,0%	0,250	(Ghosh & Bhattacharyya, 1999)
Sorgho (feuilles)	100%	94,7%	0,367	(Gunaseelan, 2004)
Sorgho (limbes)	100%	91,7%	0,407	(Gunaseelan, 2004)
Sorgho (fleurs)	100%	96,9%	0,48	(Gunaseelan, 2004)
Sorgho (racine)	100%	72,4%	0,228	(Gunaseelan, 2004)
Betterave (feuilles)	100%	81,4%	0,231	(Gunaseelan, 2004)
Betterave (feuilles)	13,6%	75,0%	0,392	(Zauner & Kuntzel, 1986)
Raisin (rafle)	100%	88,9%	0,180	(Gunaseelan, 2004)
Raisin (rafle)	100%	97,7%	0,240	(Jimenez et al., 1990)
Fruits (retraits)	22,0%	98,0%	0,270	données personnelles

II.4. Résidus sylvicoles

Sans prendre en compte les événements météorologiques notamment, on peut considérer que les déchets issus de la sylviculture sont obtenus à partir de l'activité industrielle humaine :

- Exploitation forestière : les opérations sylvicoles s'effectuent dans les forêts destinées à la production de bois. Toutes les forêts ne font pas l'objet d'une exploitation commerciale pour différentes raisons (forêts récréatives, zones protégées, accessibilité de la forêt...). Le bois exploité permet de fournir en bois l'industrie (ameublement, construction, trituration). Les coupes réalisées lors de l'exploitation des ressources génèrent des déchets. Les coupes sont de différentes natures. Il existe principalement deux

types de coupes : la première concerne l'éclaircissement des forêts qui permet de sélectionner certains arbres en abattant les autres afin de favoriser leur développement, la deuxième concerne la récolte et les résidus qui tombent lors de la découpe du bois récolté. Le bois des déchets provient donc à la fois des branches, des cimes, des souches mais également de petits arbres entiers issus des éclaircies ainsi que de tiges qui ne répondent pas aux exigences de qualité pour l'ameublement et la construction. Ces parties d'arbres qui ne sont pas ramassées et sont laissées sur place, sont appelées « rémanents de bois ».

- Première transformation du bois : les activités industrielles comme le sciage, le déroulage et le tranchage, ainsi que l'industrie de trituration (production de pâtes pour papier et de panneaux) ;

- Seconde transformation du bois : la menuiserie, le parquet, l'ameublement, l'emballage sont considérées comme des activités de seconde transformation et génèrent elles-aussi des déchets de bois.

Ces activités sont liées à l'activité économique du bois (filière bois) qui existe depuis longtemps. Les déchets de bois apparaissent également hors de la filière bois puisque le bois se retrouve dans le secteur du bâtiment pour la construction et la destruction (boiserie, charpente, encadrement de fenêtres, portes...). L'ensemble des activités industrielles et professionnelles produise des déchets de bois avec des palettes, des caisses ou des cagettes en bois. Enfin, le bois concerne également les collectivités et les particuliers puisque les collectivités sont en général responsables de la gestion des espaces verts ainsi que de la récolte des déchets municipaux.

Le Tableau 6 montre que la majorité des résidus provient des houppiers et des souches. Cela s'explique notamment par le fait que ce bois est de moins bonne facture que celui des tiges et reste donc inexploité par l'industrie traditionnelle du bois. La qualité du bois est donc un élément à prendre en compte et détermine grandement sa valorisation. Les pourcentages sont à relativiser du fait qu'ils sont moyennés : suivant le type de bois (feuillus ou conifères) et même l'espèce d'arbre, ces pourcentages peuvent varier. Les quantités relatives au bois de tiges laissé faute de qualité suffisante ainsi que celles des feuilles et tiges ne sont pas donnés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Catégories de résidus forestiers (% des volumes produits) (EDF, 2006).

Houppiers et branchages	Ecorces	Sciures	Souches
28 à 30%	3 à 5%	3 à 5%	23 à 25%

Plusieurs études, aussi bien régionales que nationales, ont fourni des estimations de résidus sylvicoles ces dernières années. Les méthodes ont évolué et sont maintenant plus précises dans les estimations. L'étude la plus récente et la plus complète provient de l'ADEME (2009) et s'intitule « Biomasse forestière, populicole et bocagère disponible pour l'énergie à l'horizon 2020 ». En tenant compte des contraintes technico-économiques (contraintes d'exploitation, contraintes économiques et contraintes environnementales) et de la part de résidus déjà valorisés, la quantité disponible serait de 20 millions de m³ par an.

Par ailleurs, les déchets de l'industrie de transformation de la matière première représenteraient environ 12 millions de tonnes par an. Cependant, l'étude indique que 90% de cette ressource est déjà

valorisée. Il semblerait donc que seulement un peu plus d'1 million de tonnes par an de déchets soient disponibles.

II.5. Conclusions

La valorisation des résidus lignocellulosiques est devenue un enjeu sur le plan énergétique notamment en Europe où ces ressources sont abondantes. Les gisements sont cependant encore incomplètement connus à la fois quantitativement, qualitativement et géographiquement même dans les bases de données de référence comme EUROSTAT ou FORESTAT.

Les différents pays de la zone européenne n'ont pas tous réalisé d'études poussées sur ces gisements, si bien que certaines données européennes ont été obtenues en moyennant celles des autres pays. Ceci révèle toute la difficulté de réaliser des estimations globales à l'échelle européenne alors que les spécificités régionales et locales peuvent être importantes. La variabilité géographique et les facteurs susceptibles de limiter la mobilisation des gisements sont ainsi mal connus ou maîtrisés.

Les ordres de grandeur sont cependant relativement fiables et révèlent que les résidus agricoles et sylvicoles sont les principaux gisements produits en Europe.

III. Caractéristiques des biomasses lignocellulosiques

III.1. Généralités

Les biomasses lignocellulosiques sont constituées de trois groupes de composants majeurs (Fan et al., 1982) : la cellulose et les hémicelluloses, polysaccharides pariétaux, et la lignine, polymère tridimensionnel de monomères dérivés du phénylpropane. La variabilité qualitative et quantitative et l'organisation de ces composants dans les différentes biomasses justifie de parler de complexes lignocellulosiques au pluriel, dont les propriétés bio-physico-chimiques sont bien différentes d'une espèce végétale à l'autre (Malherbe & Cloete, 2002).

III.2. Composés extrapariétaux

Les composés extrapariétaux correspondent aux composants non constitutifs de la paroi des cellules végétales constituant le squelette des plantes supérieures. Ces composants sont d'une très grande diversité chimique. Ils sont classés principalement sur la base de leur solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques neutres (Fan et al., 1982). Les composés extractibles sont divisés en trois groupes, les terpènes, les résines et les phénols. Le groupe des terpènes réunit essentiellement les alcools terpéniques et les cétones. Les résines incluent les acides gras, les graisses, les phytostérols et les résines acides. Les phénols correspondent à de nombreux composés aromatiques à structure phénolée dont les tannins. Les composés non-extractibles sont constitués d'une part d'éléments minéraux tels que les oxalates, carbonates, et silicates (retrouvés dans les cendres après calcination de la biomasse) et, d'autre part de molécules organiques extrapariétales non-extractibles telles que l'amidon, la pectine, et des protéines. D'après Fan et al. (1982), bien que leurs proportions dans la biomasse végétale soient mineures, les composés extrapariétaux jouent un rôle non négligeable dans la stabilité de la structure lignocellulosique (résistances aux attaques enzymatiques et biologiques).

III.3. Le polysaccharide majoritaire, la cellulose

Les composés polysaccharidiques de la structure pariétale de cellules végétales sont des polymères carbohydatés de hauts poids moléculaires, la cellulose et les hémicelluloses, qui représentent de 60 à 80% de la masse des biomasses lignocellulosiques. La cellulose est le composé structural majoritaire de la paroi des cellules végétales, et leur assure leur résistance mécanique et leur stabilité chimique (Harmsen et al., 2010). C'est d'ailleurs le composé organique le plus abondant de la biosphère. La cellulose, décrite dans la Figure 1 et dont la formule chimique est $(C_5H_{10}O_5)_n$, est un polymère d'unités dimères de cellobiose en β 1-4-polyacétal (4-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucose). La cellobiose est constituée de deux sous unités de glucose (D-glucopyranose) associées entre elles à 180° l'une de l'autre par un pont glycosidique (β 1-4). Le polymère cellulose se présente sous la forme d'une très longue chaîne sans ramification. Le degré de polymérisation (DP) de la cellulose varie selon l'origine de la plante, de 700 à 15 000 unités de glucose (mais plus communément entre 800 et 10 000), conduisant à des molécules de très hauts poids moléculaires, pouvant atteindre la valeur de 500 000

(Fengel & Wegener, 1983; Palonen & Viikari, 2004). De nombreuses propriétés physico-chimiques de la cellulose dépendent de son degré de polymérisation.

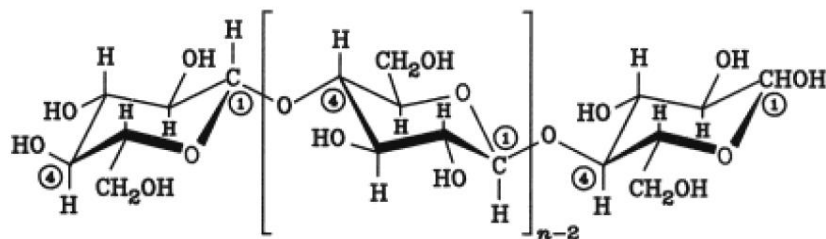


Figure 1 : Structure du polymère de cellulose d'après Harmsen (2010).

Les principaux groupes fonctionnels de la cellulose sont les fonctions hydroxyl $-OH$. Distribués de manière homogène, les fonctions $-OH$ ont la propriété de former des liaisons hydrogènes avec les atomes $-O$, $-N$, et $-S$, et également avec les fonctions $-OH$ d'autres chaînes de cellulose. La chaîne polymérique linéaire présente une fonction aldéhyde à l'une de ses extrémités (notée C1), qui lui confère des propriétés réductrices.

Les fonctions $-OH$ contribuent largement aux propriétés hydrophiles de la cellulose. La cellulose est relativement hygroscopique, capable d'absorber de 8 à 14% de sa masse d'eau sous conditions normales de pression et de température ($20^{\circ}C$, 60% d'humidité relative) (Harmsen *et al.*, 2010). Cependant, et malgré la présence des fonctions $-OH$, la cellulose est totalement insoluble et gonfle en présence d'eau.

Par ailleurs, la répétition du motif cellobiose et la distribution homogène des fonctions $-OH$ sur les chaînes linéaires sans ramification favorisent la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes, conduisant à la formation d'une structure tridimensionnelle constituée de plusieurs chaînes de cellulose en parallèle (*cf.* Figure 2).

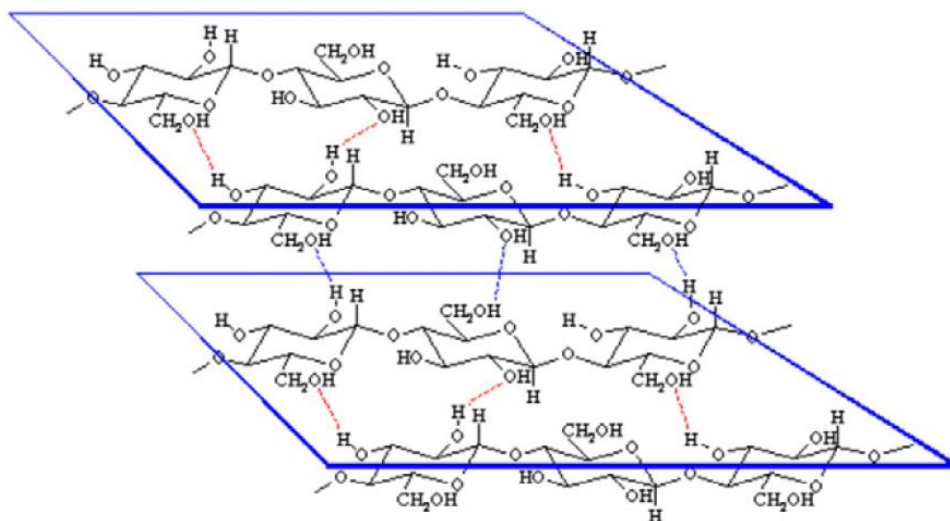


Figure 2 : Organisation tridimensionnelle du polymère de cellulose d'après Harmsen (2010).

Par conséquent, la cellulose existe sous deux états structuraux : la cellulose amorphe et la cellulose cristalline où les polymères s'organisent sous la forme d'une maille cristalline dont la cohésion est

assurée par les liaisons hydrogène. La maille cristalline est constituée de plusieurs chaînes en parallèles (cf. Figure 3).

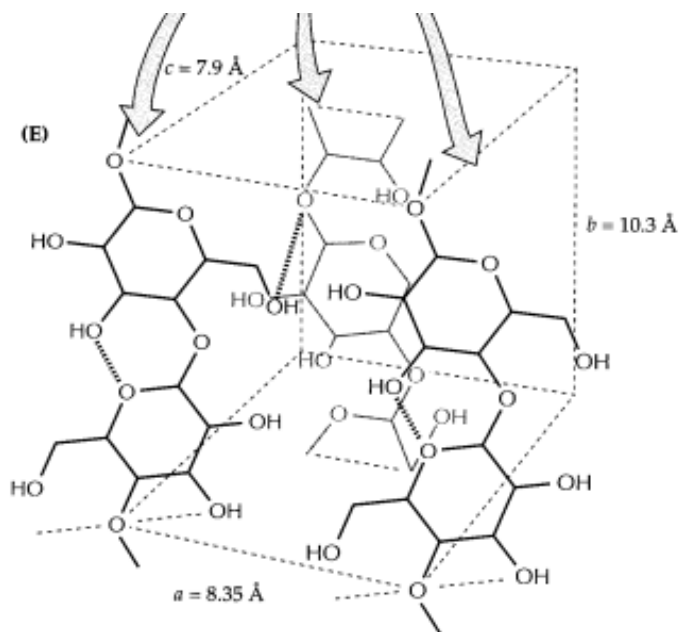


Figure 3 : Maille cristalline de la cellulose.

Sept structures cristallines ont été identifiées pour la cellulose et notées I_α , I_β , II, III_I , III_{II} , IV_I , and IV_{II} d'après O'Sullivan (1997) cité par Palonen (2004). La forme native de la cellulose est la cellulose I qui est un composite des deux phases cristallines distinctes I_α (triclinique) et I_β (monoclinique) en proportion variable selon l'origine de la cellulose (Atalla & Vanderhart, 1984). Ainsi, les celluloses synthétisées par les organismes primitifs tels que les algues et les bactéries sont riches en phase I_α tandis que celles produites par les plantes supérieures (bois, coton, ramie) contiennent plus de phase I_β (Boisset et al., 1999). La cellulose I est le polymorphe le plus abondant dans la nature. Les différentes autres formes cristallines de la cellulose peuvent être obtenues par des traitements chimiques. La cellulose II peut être préparée à partir de la cellulose I par mercerisation (traitement par une solution de soude à 25% à 20°C) ou par régénération (solubilisation suivie d'une recristallisation). La transition cellulose I \rightarrow cellulose II est irréversible ce qui démontre que la cellulose II est thermodynamiquement plus stable que la cellulose I. Les celluloses III_I et III_{II} peuvent respectivement être obtenues à partir de cellulose I et de cellulose II par traitement à l'ammoniac liquide selon des réactions réversibles. Les celluloses IV_I et IV_{II} sont respectivement préparées par chauffage des celluloses III_I et III_{II} . Ces transformations $III \rightarrow IV$ sont irréversibles (Gardiner & Sarko, 1985).

III.4. Les hémicelluloses

Si la structure chimique de la cellulose est la même dans les différentes espèces, les hémicelluloses varient considérablement selon l'essence, et notamment entre les bois durs et les bois tendres. Les hémicelluloses de feuillus sont généralement plus riches en pentoses, tandis que les hémicelluloses de résineux contiennent habituellement davantage d'hexoses. Les hémicelluloses sont solubles dans les solutions alcalines. Elles sont plus facilement hydrolysées par les acides que la cellulose et, par conséquent, sont facilement converties en oses et en acides uroniques avec des procédés doux (acides dilués). Les hémicelluloses se distinguent également de la cellulose par leurs masses molaires

nettement plus faible et par la présence de chaînes latérales courtes branchées sur la chaîne polymérique principale.

La dénomination « hémicelluloses » réunit les polymères hydrocarbonés constitués d'unités monomériques sucres associés entre eux par plusieurs types de liaisons glycosidiques. Les monosaccharides incluent les pentoses C5 (xylose, rhamnose et arabinose), les hexoses C6 (glucose, mannose et galactose) et les acides uroniques (tels que l'acide 4-O-méthyl-glucuronique, l'acide D-glucuronique et l'acide D-galacturonique). Les xyloses et les mannoses sont les monomères les plus abondants. Il s'agit donc d'hétéropolymères constitués de chaînes principales généralement de anhydro- β -(1-4)-D-xylopyranose, mannopyranose, glucopyranose et galactopyranose avec de nombreuses substitutions et ramifications (Jeffries, 1994). Les hémicelluloses sont chimiquement associées à d'autres polysaccharides, aux protéines et à la lignine. Les xylanes, polymères de xyloses, auraient d'ailleurs un rôle majeur dans l'interface entre la lignine et les polysaccharides (Jeffries, 1991).

Les hémicelluloses des bois tendres et bois durs se distinguent par leur composition : les hémicelluloses des bois durs et plantes annuelles sont majoritairement constituées de xyloses (15-30%), tandis que les hémicelluloses de bois tendres se composent de galacto-glucomannanes (15-20%) et de xylanes (7-10%). Les xylanes de bois durs sont constitués d'unités β -D-xylopyranosyl, qui contiennent un acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique et des fonctions acétyles. L'acide méthylglucuronique est lié à la chaîne polymérique de xylanes par une liaison glycosidique O-(1-2) et estérification des fonctions OH en C2 ou C3 par l'acide acétique. Le ratio molaire xylose/acide glucuronique/résidus acétyl est de 10/1/7 pour le bois dur. Les xylanes de bois tendre sont les arabino-4-O-méthylglucuronoxylanes qui ne sont pas acétylés, mais où la chaîne polymérique de xylanes est substituée sur C2 et C3 respectivement par un acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique et des résidus - α -L-arabino-furanosyl (Fengel & Wegener, 1983).

Les différents types d'hémicelluloses rencontrées chez les angiospermes (feuillus et graminées) sont illustrés dans les Figure 4 Figure 6 tandis que celles qui caractérisent les gymnospermes (conifères) sont représentées dans les Figure 5 et Figure 7.

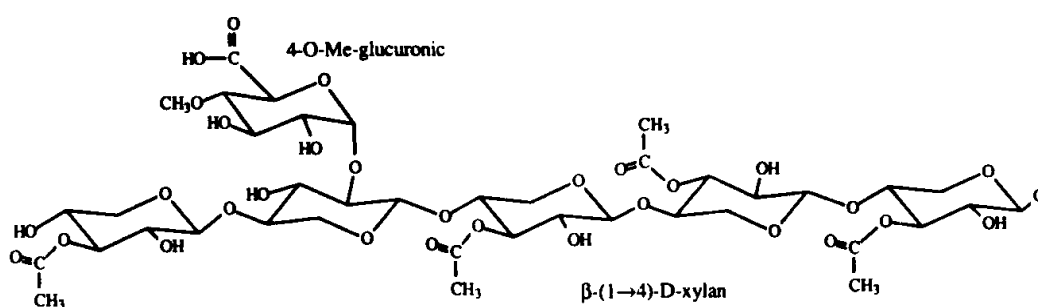


Figure 4 : O-Acetyl-4-O-méthyl- D-glucuronoxylane des angiospermes d'après Dekker (1985).

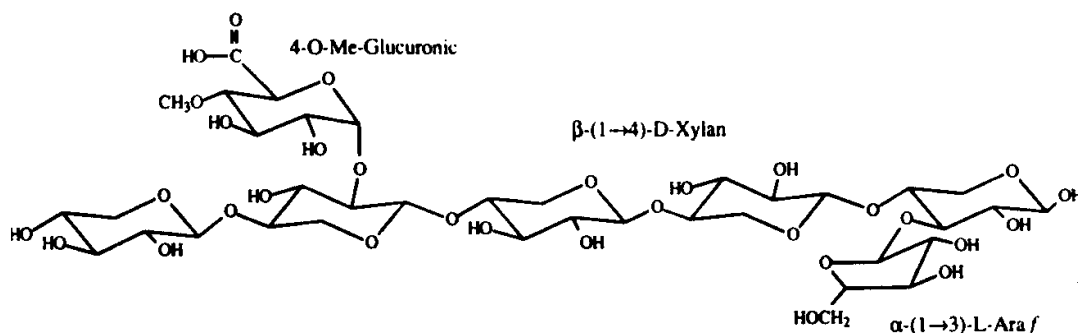


Figure 5 : Arabino-4-O-methylglucuronoxylane des gymnospermes d'après Dekker (1985).

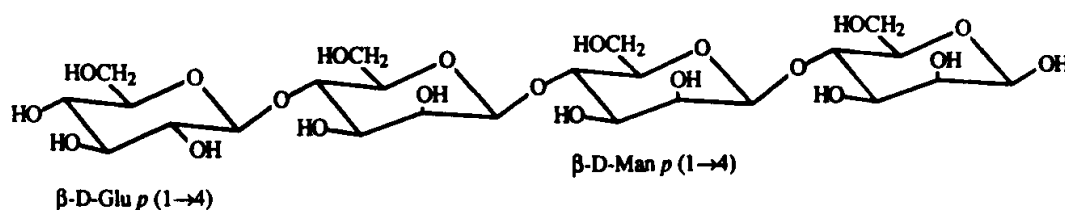


Figure 6 : Glucomannane des angiospermes d'après Dekker (1985).

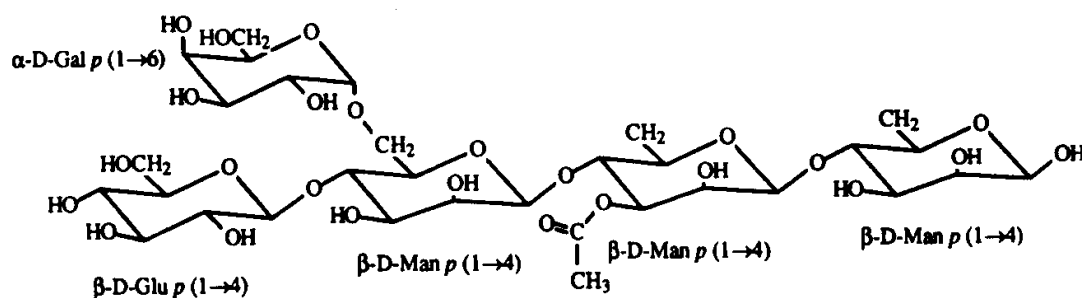


Figure 7 : O-Acetylgalactoglucomannane des gymnospermes d'après Dekker (1985).

Les glucuronoxylanes de la plupart des bois durs et de certaines graminées sont constitués d'un squelette polymérique de β -(1-4)-D-xylane avec des substitutions d'acide α -(1-2)-D-glucuronic sur 10% des résidus de xylose (*cf.* Figure 4). Les xylanes des bois tendres et de la plupart des graminées se caractérisent par des unités d'arabinofuranose associée en α -(1-3) à la chaîne polymérique de xylane (*cf.* Figure 5). Les glucomannoxylane des angiospermes (principalement glucomannanes and galactomannanes) sont des chaînes linéaires d'unités de β -(1-4)-D-glucopyranose et β -D-mannopyranose. Les glucomannanes des bois durs sont constitués d'une chaîne principale d'unités de mannose et glucose associées par des liaisons osidiques β -(1-4) (*cf.* Figure 6). Les glucomannanes des bois tendres se distinguent des précédents par la présence de ramifications d'unités galactoses, associées en α -(1-6) aux unités mannose de la chaîne principale (*cf.* Figure 7).

La diversité des hémicelluloses se traduit par des propriétés bio-physico-chimiques très variables selon l'espèce végétale considérée. Par contraste avec la cellulose, les hémicelluloses sont des polymères facilement hydrolysables par voie chimique ou par voie enzymatique (Kumar et al., 2009). En outre la variabilité des unités monomériques qui les constituent ne leur permet pas de développer une structure cristalline, bien que les hémicelluloses puissent être co-cristallisées avec la cellulose.

III.5. La lignine

La lignine est l'un des principaux constituants des biomasses lignocellulosiques. Elle représente 20 à 30% du carbone de la biomasse végétale. Après la cellulose, c'est le second composé organique le plus abondant de la biosphère. La lignine est un nom générique pour désigner un ensemble de polymères phénoliques tridimensionnels, de masses moléculaires élevées, ramifiés, de compositions et de structures variables et complexes. Localisé dans la paroi primaire des cellules végétales, elle leur confère imperméabilité, rigidité et inextensibilité. La lignine se présente comme un réseau structural tridimensionnel insoluble dans l'eau et très résistant aux attaques chimiques et enzymatiques. La très grande stabilité de la lignine associée à celle de la cellulose explique son rôle significatif dans la résistance mécanique, chimique et biologique de la grande majorité des biomasses lignocellulosiques (Fengel & Wegener, 1983).

La complexité des lignines et la diversité de leurs structure proviennent de l'association des trois monolignols par différentes liaisons chimiques sans caractère ordonné ni répétitif pour former un polymère amorphe et hydrophobe. La lignine est un polymère constitué de trois types d'unités *p*-hydroxyphényles H, guaiacyles (4-hydroxyl-3-methoxyphenyl) G et syringyles (4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) S, issues de la polymérisation peroxydasique de 3 alcools (monolignols) précurseurs (*cf.* Figure 8 Figure 9, d'après Lapierre (2010)) : alcool *p*-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique.

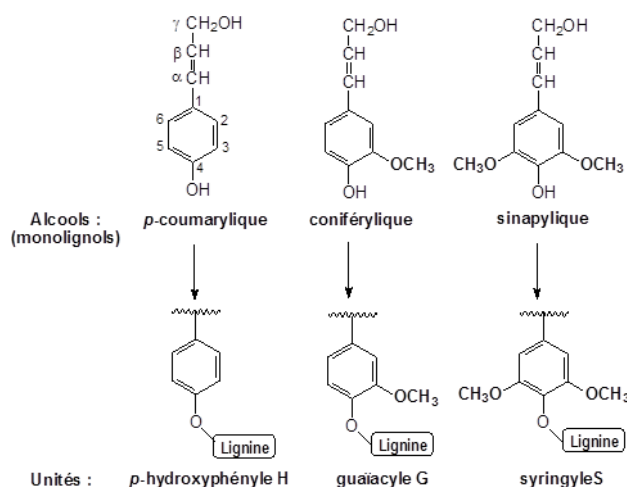


Figure 8 : Structure des 3 monolignols précurseurs des unités *p*-hydroxyphényles H, guaiacyles G et syringyles S constitutives des lignines d'angiospermes. Les numéros ou codes des carbones aromatiques et des carbones de la chaîne propane sont représentés pour un des monolignols.

Les unités H sont en général très minoritaires et difficilement quantifiables chez les angiospermes dicotylédones, et sont observables en petite quantité chez les graminées. Les unités G et S dominent, mais en proportions variable selon l'origine botanique et la nature des tissus (Lapierre, 2010). D'une manière générale, les gymnospermes (bois tendres) contiennent essentiellement le monomère G (avec de faibles quantités d'unités H). Les angiospermes dicotylédones (bois durs) contiennent les deux unités G et S (avec de faibles quantités d'unités H). Les angiospermes monocotylédones (herbes) contiennent les trois unités H, G et S (Lapierre, 2010). La lignine des bois tendres se caractérise par la prédominance de l'alcool coniférylique qui représente 90%, les 10 autres % étant majoritairement constitués par l'alcool *p*-coumarylique.

Les unités dans la lignine sont liées par diverses liaisons chimiques qui ont des propriétés chimiques différentes. Ces liaisons peuvent être regroupées en deux classes (Adler, 1977) : les liaisons interunités éthers « labiles » de type β -O-4, point faible des lignines et cible des procédés de délignification industrielle ; et les liaisons interunités résistantes dites « condensées » types C-C (biphényle 5-5, diaryl-propane β -1, phénylcoumarane β -5, résinole β - β) et diaryl-éther (*cf.* Figure 9). Les liaisons covalentes entre monomères sont identiques dans les lignines constitutives des bois tendres, durs et de la biomasse des graminées (Jeffries, 1994).

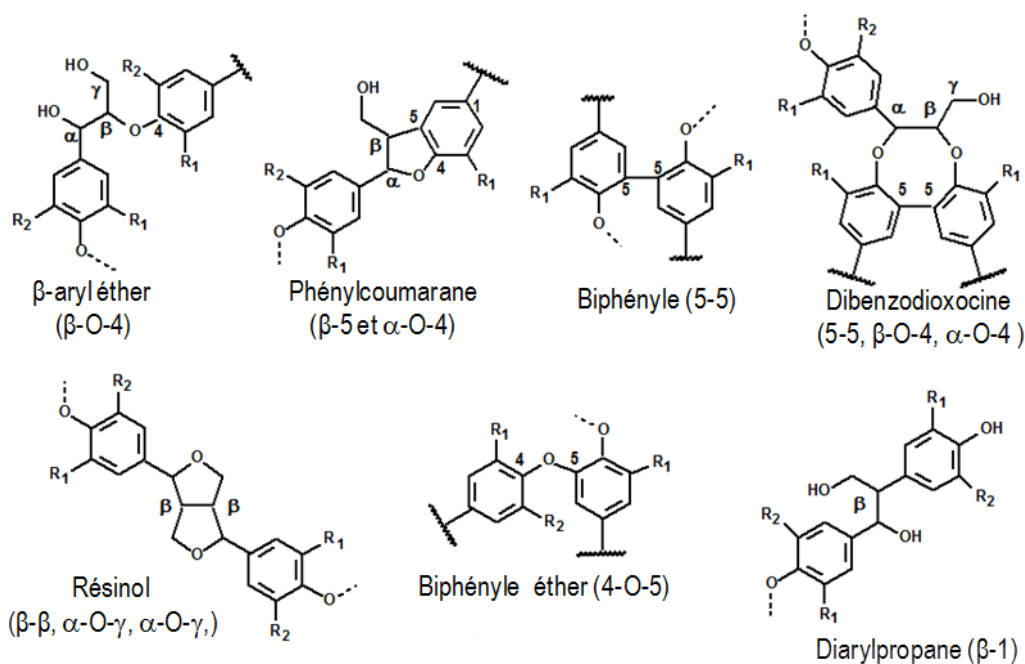


Figure 9 : Principaux types de modes de liaisons interunités dans les lignines (R1 et R2 = H ou OCH₃), avec leur nomenclature usuelle (adapté de Lapierre 2010). (Lapierre, 2010)

La lignine n'est donc pas considérée comme une structure homogène (Jeffries, 2004). Selon l'espèce et en fonction du tissu végétal considéré, la lignine se présente soit sous forme amorphe, soit sous une forme structurée, globulée ou bien oblong (Novikova et al., 2002). Toutefois, d'après les mêmes auteurs, la lignine présente dans les plantes supérieures ne serait pas amorphe. Les noyaux aromatiques seraient alignés sur le plan de la paroi cellulaire (Palonen, 2004).

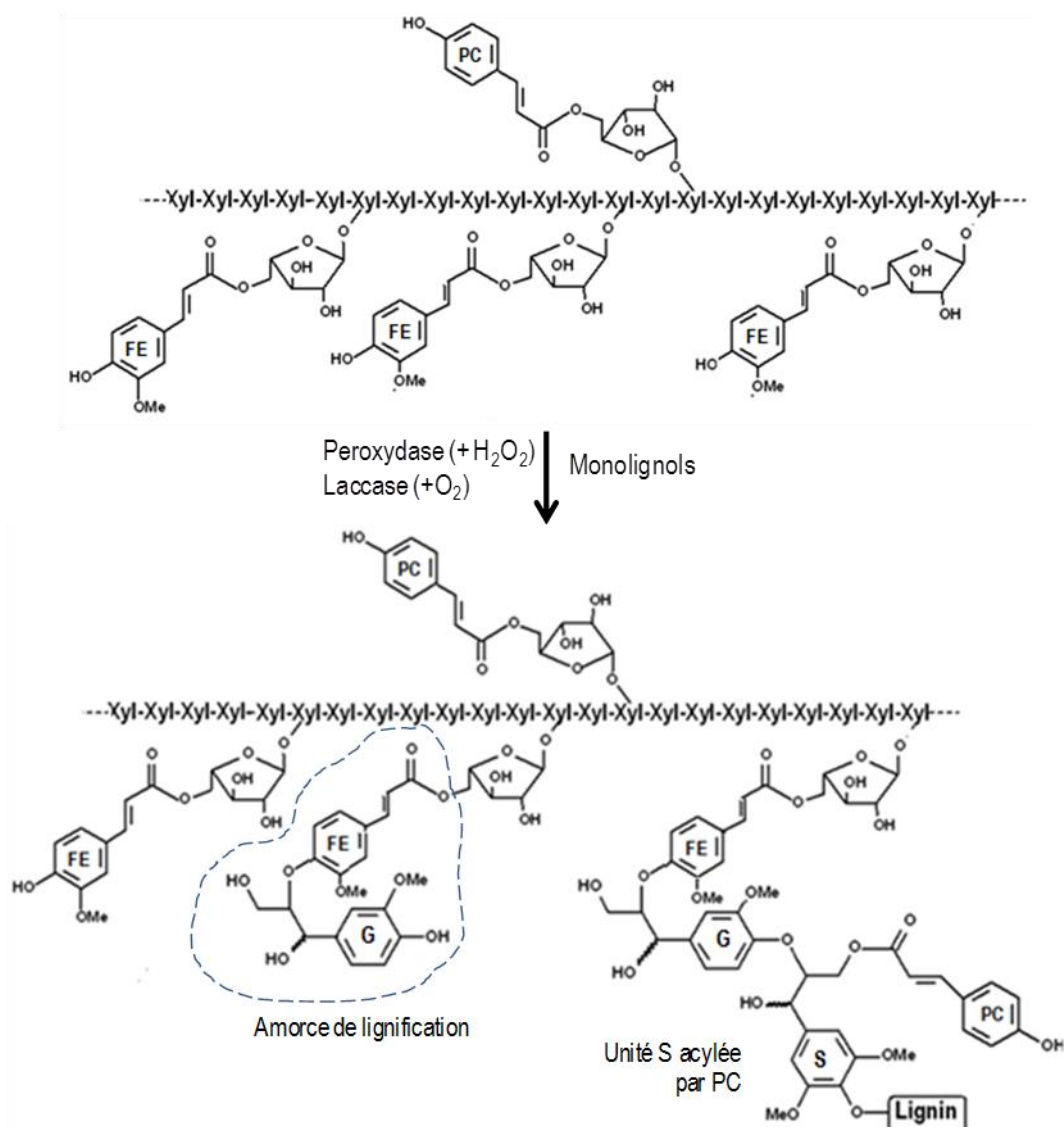


Figure 10 : Mode d'association des lignines, des arabinoxyldes et des esters p-coumariques (PC) et féruliques (FE) dans les parois secondaires de graminées. Avant lignification (au dessus de la flèche), les arabinoxyldes de graminées sont acylés surtout par FE (et un peu par PC). Au cours de la lignification, les esters féruliques peuvent être oxydés en radicaux et se coupler à un radical d'alcool coniférylique pour former l'amorce de lignification (entourée de tirets). La lignification se poursuit sur cette amorce avec couplage d'autres radicaux, dont celui issu de l'alcool sinapylique p-coumaroylé, ce qui génère la formation d'une unité S acylée par PC.

III.6. Composition des biomasses lignocellulosiques

Comme nous l'avons déjà mentionné, les lignocelluloses sont des biomasses végétales constituées de composés classés en fonction de leur extractibilité et, par conséquent, de leurs caractéristiques chimiques (Fan et al., 1982). On distingue ainsi les composés extrapariétaux, la cellulose, les hémicelluloses, et la lignine. Nettement minoritaires dans les bois tendres et durs, les composés extrapariétaux ne sont généralement pas pris en compte dans l'analyse des biomasses lignocellulosiques. Le Tableau 7 présente une synthèse de données sur la composition de biomasses lignocellulosiques dont la conversion en biocarburants est à l'étude.

Tableau 7 : Composition de biomasses lignocellulosique

Biomasses lignocellulosiques	Cellulose (%)*	Hemicellulose (%)*	Lignine (%)*	Ref.
Barley hull	34	36	19	(Kim et al., 2008; Menon & Rao, 2012)
Barley straw	36-43	24-33	6.6-9.8	(García-Aparicio et al., 2006; Menon & Rao, 2012; Rowell et al., 1992)
Bamboo	49-50	18-20	23	(Alves et al., 2010; Menon & Rao, 2012; Reguant & Rinaudo, 2000)
Banana waste	13	15	14	(Menon & Rao, 2012; Monsalve G., 2006)
Corn cobs	32.3-45.6	39.8	6.7-13.9	(Cao et al., 1997; McKendry, 2002; Menon & Rao, 2012)
Corn stover	35.1-39.5	20.7-24.6	11.0-19.1	(Menon & Rao, 2012; Mosier et al., 2005)
Cotton stalk	31	11	30	(Menon & Rao, 2012; Rubio et al., 1998)
Douglas fir	35-48	20-22	15-21	(Menon & Rao, 2012; Schell et al., 1999)
Grasses	25-40	25-50	10-30	(Menon & Rao, 2012; Stewart et al., 1997)
Hardwood stems	40-55	24-40	18-25	(Howard et al., 2004; Malherbe & Cloete, 2002; Sanchez, 2009)
Loblolly pine (soft wood)	44	21	27	(Dwivedi et al., 2009; Frederick et al., 2008)
Newspaper	40-55	24-39	18-30	(Howard et al., 2004; Menon & Rao, 2012)
Olive tree biomass	25.2	15.8	19.1	(Cara et al., 2008; Menon & Rao, 2012)
Pine	42-49	13-25	23-29	(Menon & Rao, 2012; Pereira, 1988)
Poplar wood	45-51	25-28	10-21	(Menon & Rao, 2012; Torget &

Rice straw	29-39	23-26	6-19	Teh-An, 1994) (Brylev et al., 2001; Chandra et al., 2012; Prasad et al., 2007)
Rice husk	29-38	12-29	15-20	(Chandra et al., 2012; Menon & Rao, 2012)(Abbas & Ansumali, 2010; Allen et al., 2001)
Softwood stem	45-50	24-40	18-35	(Howard et al., 2004; Malherbe & Cloete, 2002; Sanchez, 2009)
Sorghum straw	32-35	24-27	15-21	(Herrera et al., 2003; Menon & Rao, 2012; Vázquez et al., 2007)
Sugarcane bagasse	25-45	28-32	15-25	(Alves et al., 2010; Menon & Rao, 2012; Singh et al., 2009)
Sugarcane tops	35	32	14	(Jeon et al., 2010; Menon & Rao, 2012)
Switchgrass	35-40	25-30	15-20	(Howard et al., 2004; Menon & Rao, 2012)
Yard waste	22	14	26	(Liew et al., 2012)
Water hyacinth	18.2-22.1	48.7-50.1	3.5-5.4	(Aswathy et al., 2010; Menon & Rao, 2012; Nigam, 2002)
Wheat straw	35-39	22-30	12-16	(Grohmann et al., 1986; Menon & Rao, 2012; Prasad et al., 2007)
Wheat bran	10.5-14.8	35.5-39.2	8.3-12.5	(Menon & Rao, 2012; Miron et al., 2001)
Winter rye	29-30	22-26	16.1	(Menon & Rao, 2012; Petersson et al., 2007)

* Pourcentage exprimés en matière sèche.

Les proportions de cellulose, hémicelluloses et lignine sont dépendantes de l'origine de la ressource. Des variations significatives en hémicellulose et lignine sont observées entre les biomasses végétales types bois durs, bois tendre et biomasse de graminées.

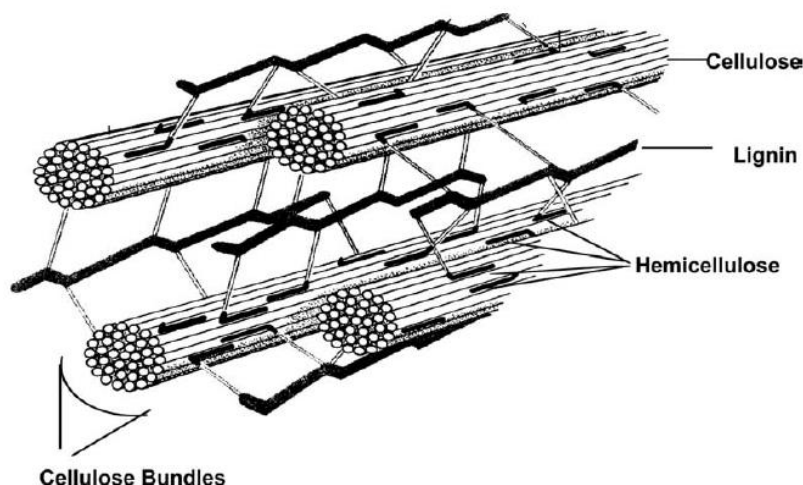


Figure 12 : Modèle d'organisation du complexe lignocellulosique d'après Fengel & Wegner, 1984 in Shleser, 1994.

Ainsi, dans les parois secondaires des tissus du bois, les microfibrilles de cellulose sont organisées en macrofibrilles liées dans un réseau d'hémicellulose et de lignine. D'après Wertz (2010), la réticulation de ce réseau serait liée à l'absence d'eau de la paroi, qui s'explique par la forte hydrophobicité de cette structure composite. L'hydrophobicité a également pour conséquence de limiter l'accessibilité des enzymes et explique la récalcitrance vis-à-vis de la biodégradation. Par ailleurs, la lignine est un polymère reconnu pour sa résistance à la dégradation chimique et biologique (Dashtban et al., 2010). Associée à l'hémicellulose et aux macrofibrilles de cellulose par différents types de liaison intra et extra-polymère, elle crée une barrière physique et chimique.

Ces liaisons assurent les connexions intra-polymères (liaison entre deux monomères voisins d'une même chaîne) et inter-polymères (liaison entre polymères de natures différentes). Elles sont décrites dans le Tableau 8 suivant d'après Faulon *et al.*, 1994).

L'identification des liaisons inter-polymères est délicate, étant donné qu'elle nécessite la destruction du complexe lignocellulosique afin de séparer individuellement les différentes catégories et de les identifier. Malheureusement, la destructuration et l'extraction des composés conduit inévitablement à l'altération de leurs propriétés chimiques et de leur structure initiale. Néanmoins, certaines liaisons ont pu être identifiées (Faulon *et al.*, 1994) :

- liaisons covalentes ester entre les hémicelluloses et la lignine et éther entre la lignine et les polysaccharides mais sans avoir pu distinguer si ces liaisons concernaient la cellulose ou bien l'hémicellulose ;
- liaisons hydrogène (non covalentes) entre la cellulose et les hémicelluloses, probablement de faible intensité en raison du déficit de fonction $-OH$ sur les unités glycopyranose.

Tableau 8 : Présentation des principales liaisons chimiques du complexe lignocellulosique d'après Faulon et al. (1994).

Liaisons intra-polymères	
Ether C-O-C	Lignine, hémicelluloses
C-C	Lignine
Liaison hydrogène	Cellulose
Ester	Hémicelluloses
Liaisons extra-polymères	
Ether	Cellulose-lignine
	Hémicelluloses-lignine
Ester	Hémicelluloses-lignine
Liaison hydrogène	Hémicelluloses-lignine
	Cellulose-lignine
	Cellulose-hémicelluloses

IV. Méthanisation de biomasses lignocellulosiques

IV.1. Généralités sur la méthanisation

IV.1.1. Principe

La méthanisation est un traitement anaérobie permettant de produire du méthane (CH_4) par digestion anaérobie. Le biogaz peut être utilisé comme combustible et le digestat, produit solide final de la digestion anaérobie, comme amendement organique des sols après une opération de maturation aérobie complémentaire (Bayard et Gourdon, 2010). A l'échelle du réacteur, le digesteur, la méthanisation doit s'effectuer en système étanche (fosses, cuves fermées,...) pour favoriser l'anaérobiose ainsi que la syntrophie obligatoire entre les différentes populations microbiennes. Les micro-organismes sont de phylum et de caractéristiques métaboliques très diverses, et sont impliquées dans des fonctions spécifiques dans les étapes successives de la biodégradation de la matière organique. La biodégradation anaérobie de la matière organique est en effet un processus séquentiel comportant quatre étapes biochimiques réalisées par trois groupes microbiens fonctionnant en symbiose et ayant des exigences nutritives et des caractéristiques physiologiques distinctes :

- Bactéries hydrolytiques acidogènes ;
- Bactéries acétogènes ;
- Bactéries méthanogènes : méthanogènes acétoclastes, méthanogènes hydrogénophiles.

La méthanisation se déroule en 4 étapes biochimiques (*cf.* Figure 13) :

- 1- Hydrolyse ;
- 2- Acidogenèse ;
- 3- Acétogenèse ;
- 4- Méthanogenèse.

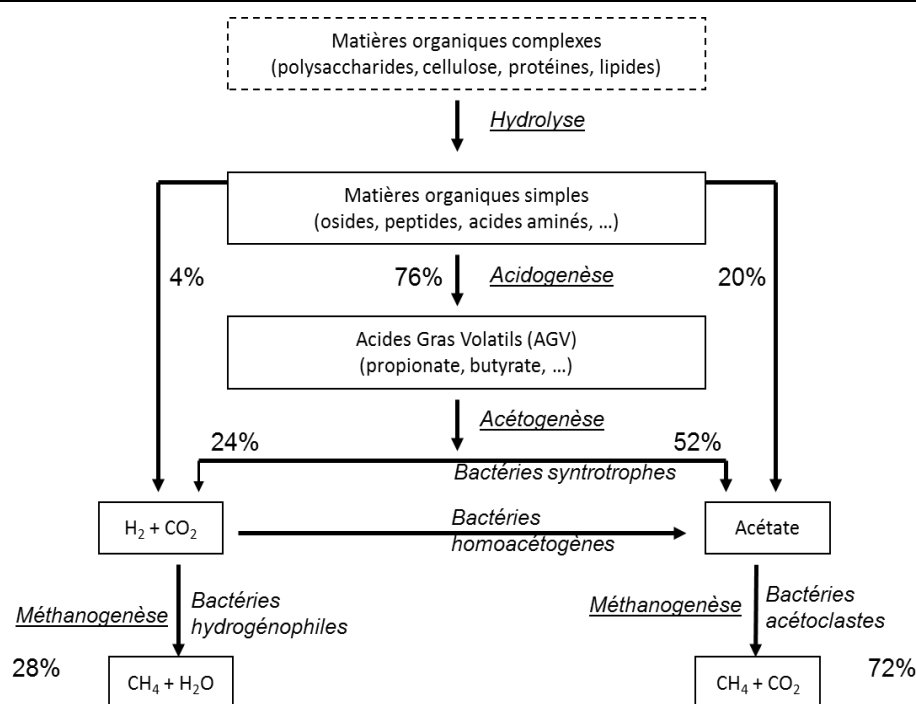


Figure 13 : Représentation simplifiée des étapes de biodégradation anaérobie de la matière organique des déchets de biomasse.

IV.1.2. Hydrolyse

En conditions anaérobies, l'étape d'hydrolyse est réalisée par des bactéries acidogènes hydrolytiques par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaires. Elle concerne la transformation des molécules organiques complexes en monomères. Les substrats tels que les polysaccharides sont hydrolysés en sucres simples. Cette première phase de la dégradation est souvent considérée comme l'étape cinétiquement limitante du processus méthanogène dans son intégralité, en particulier dans le cas de biomasses peu ou pas solubles, comme c'est très souvent le cas des biomasses lignocellulosiques (Mata-Alvarez et al., 2000; Noike et al., 1985; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991; Vavilin et al., 1996). L'hydrolyse est une transformation qui s'effectue à l'extérieur des cellules, impliquant des enzymes extracellulaires (exo-enzymes).

IV.1.3. Acidogenèse

L'acidogenèse est une étape fermentaire anaérobie qui conduit à la formation d'acides organiques à partir des monomères issus de l'hydrolyse. Elle s'effectue sans accepteur ou donneur d'électron inorganique additionnels (Batstone et al., 2002; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991). Cette étape est rapide et peut entraîner l'acidification du milieu. Les monomères issus de l'hydrolyse de la biomasse (sucres, acides aminés, ...) sont convertis principalement en acides gras volatils (AGV) tels que le formate ($HCOOH$), acétate (CH_3COOH), le propionate (CH_3CH_2COOH), et en dioxyde de carbone (CO_2) et dihydrogène (H_2). En présence de dihydrogène dans le cas de faible activité des bactéries méthanogènes notamment, la dégradation des sucres va conduire à la formation de nombreux autres produits tels que le butyrate ($CH_3CH_2CH_2COOH$), le lactate ainsi que des alcools. (Chynoweth & Pullammanappallil, 1996; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991).

La microflore impliquée dans les deux premières étapes (hydrolyse et acidogenèse) sont des bactéries anaérobies facultatives. Elle se distingue des autres populations microbiennes par leur développement

rapide et leur tolérance vis-à-vis du pH relativement bas (jusqu'à 5) ce qui en fait des organismes à développement peu contraignant (Bayard et Gourdon, 2010).

IV.1.4. Acétogénèse

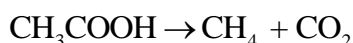
L'acétogénèse est la transformation des AGV en acétate, CO₂ et H₂ principalement. A la différence des deux étapes précédentes, elle nécessite la présence d'un accepteur d'électron inorganique, H⁺ (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991). L'acétogénèse est réalisée par un groupe particulier de bactéries anaérobies strictes, les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (OHPA en anglais). Les produits de l'étape acidogénèse autres que les AGV (alcools etc....) sont transformés en acides par les bactéries acidogènes, lesquels acides servent de substrats aux bactéries acétogènes. Toutes les bactéries acétogènes (OHPA) produisent de l'H₂. Thermodynamiquement, la dégradation des AGV en acétate n'est possible qu'à de faibles pressions partielles en H₂. Il faut par exemple p_(H₂) < 10⁻⁴ atm pour que la transformation du propionate en acétate soit possible. Il faut donc une syntrophie très étroite entre les bactéries acétogènes et d'autres bactéries capables de consommer l'H₂ produit (méthanogènes, sulfato-réductrices, ...).

L'homoacétogénèse est seconde voie de production d'acétate en conditions anaérobie. Cette réaction a lieu à partir du dihydrogène et du bicarbonate (*cf.* Figure 13). Elle contribue à la régulation d'un niveau bas en hydrogène dans le milieu (Siriwongrungron et al., 2007).

IV.1.5. Méthanogénèse

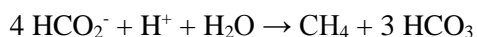
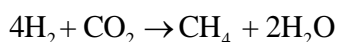
La méthanogénèse est réalisée par les bactéries méthanogènes qui sont des bactéries anaérobies strictes, classées parmi le règne des archæ (Chynoweth & Pullammanappallil, 1996). Elles utilisent un nombre très réduit de composés carbonés : le formate pour beaucoup d'espèces, l'acétate, le méthanol et le méthylamine pour quelques espèces. Deux voies de production du méthane prédominent :

- l'acétoclastie, à partir de l'acétate, selon la réaction :



Les méthanogènes qui consomment l'acétate (acétotrophes) sont responsables de 70 % de la production de méthane ;

- la réduction du dioxyde de carbone par l'hydrogène, réalisée par les bactéries hydrogénotrophes, selon deux réactions :



Les bactéries méthanogène se caractérisent, tout comme les acétogènes, par, un développement lent, un caractère anaérobie strict et une forte sensibilité au pH. L'optimum se situe autour de la neutralité. La fourchette optimale admise est variable selon les sources : entre 6,8 et 7,4 selon Barlaz (1996).

IV.2. Biodégradabilité anaérobie des biomasses lignocellulosiques

IV.2.1. Principe

Les biomasses présentes dans les gisements urbains (DMA, déchets verts), agricoles (résidus de l'élevage et de cultures), et forestiers (résidus des activités sylvicoles et de l'industrie de la transformation du bois) ont pour caractéristique commune d'être majoritairement constituées de lignocelluloses, dont la structure complexe rend difficile leur biotransformation, en particulier l'hydrolyse (Hendriks & Zeeman, 2009). La destructuration du complexe lignocellulosique est donc un enjeu majeur de la valorisation des biomasses lignocellulosiques, qu'il s'agisse de la production de biocarburants (éthanol, méthane et dihydrogène), de papier ou autres matériaux biosourcés (Chandra et al., 2012; Hendriks & Zeeman, 2009; Monlau et al., 2013; Mosier et al., 2005; Mtui, 2009; Taherzadeh & Karimi, 2008). Nous analyserons par la suite les principales caractéristiques des biomasses lignocellulosiques qui influent leur biodégradabilité anaérobie, parmi lesquels la composition, et la structuration sont les plus couramment citées.

Il est couramment admis par la communauté scientifique que la lignine augmente la résistance des biomasses lignocellulosiques à la biodégradation anaérobie. Toutefois, la corrélation entre la teneur en lignine et biodégradabilité n'est pas clairement établie, comme le montre la disparité des données disponibles (Liew et al., 2012). La cellulose, les hémicelluloses et la lignine sont présents en proportions variables selon l'origine de la matière considérée (Jeffries, 1990). De nombreux scientifiques ont tenté d'établir le lien entre le potentiel biométhanogène et le taux de lignine sur un large spectre de biomasses : papiers journaux (Stinson & Ham, 1995), fractions organiques de DMA issus du bois (Barlaz, 2006), résidus agricoles (Chandler *et al.*, 1980 ; Gunasselan, 2004, 2007 ; Monlau *et al.*, 2012), et sur biomasses d'origines diverses (Tong *et al.*, 1990 ; Eleazer *et al.*, 1997 ; Buffière *et al.*, 2006). Les résultats d'une étude à l'autre ne sont pas toujours faciles à comparer (techniques de caractérisation variables d'une publication à l'autre) et parfois contradictoires lorsqu'il s'agit d'expliquer l'influence de la structure lignocellulosique sur le potentiel biométhanogène. La relation quantitative entre le PBM et teneur en lignine varie selon les origines et caractéristiques des biomasses étudiées (Barlaz, 2006). En effet, Tong et coll. (1990) ont pu mettre en évidence sur des déchets alimentaires des taux de biodégradation anaérobie très différents, alors que leurs teneurs en lignine étaient identiques. Les travaux de Eleazer et coll. (1997) sur fractions de DMA (papiers de bureau, papiers journaux, papiers magazine, déchets alimentaires...) et divers déchets verts (graine, herbes, feuilles, branches) confirment que la teneur en lignine n'est pas un paramètre suffisant pour prédire la biodégradabilité anaérobie des polymères.

IV.2.2. Cellulose

La biodégradabilité de la cellulose dépend étroitement de son accessibilité vis-à-vis des exo-enzymes susceptibles de l'hydrolyser. Trois types d'exo-enzymes sont nécessaires dans le cas de la cellulose : les β -1-4-endo-glucanases pour attaquer les régions amorphes de la cellulose libérant de courtes chaînes d'oligosides ; les β -1-4-exo-glucanases ou cellobio-hydrolases qui conduisent à la formation de cellobiose ; et les β -glucosidases qui hydrolysent la cellobiose en glucose (Mussatto & Teixeira, 2010).

L'accessibilité enzymatique des polymères est donc primordiale pour garantir leur hydrolyse enzymatique, raison pour laquelle la délignification des biomasses est considérée comme le facteur clé

de leur bioconversion (Malherbe et Cloete, 2002). De nombreux auteurs s'accordent à considérer que les régions amorphes accessibles de la cellulose sont plus facilement hydrolysables, se traduisant par l'observation que plus le degré de cristallinité de la biomasse est faible, plus sa digestibilité est élevée (Fan *et al.*, 1980). L'augmentation du degré de cristallinité après digestion de biomasses lignocellulosiques confirment cette observation (Hayashi *et al.*, 2005). A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence une plus grande digestibilité de la cellulose cristalline (Wyman, 1996 ; Grethlein, 1985), soulignant la nécessité de prendre en considération d'autres caractéristiques du complexe lignocellulosique telles que le poids moléculaire du polymères, la porosité et la surface accessible aux exo-enzymes afin de prédire la digestibilité de biomasses lignocellulosiques de propriétés très variables selon leurs origines (Taherzadeh & Karimi, 2008 ; Monlau *et al.*, 2013).

IV.2.3. Hémicelluloses

L'influence des caractéristiques des hémicelluloses sur l'accessibilité des biomasses lignocellulosiques et leur bioconversion en méthane est encore peu étudiée (Monlau *et al.*, 2013). Cette influence est sans aucun doute non négligeable car les hémicelluloses représentent de 15 à 30% de la biomasse totale. Les hémicelluloses jouent un rôle majeur dans l'organisation du complexe lignocellulosique, en assurant le lien entre la lignine et les fibres de cellulose. Par conséquent, de nombreux prétraitements de biomasses ciblent l'attaque des hémicelluloses avec pour conséquence recherchée d'augmenter l'accessibilité de la cellulose (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Comme déjà mentionné, les hémicelluloses se distinguent de la cellulose par une grande variabilité structurale et chimique (Jeffries, 1994). Les hémicelluloses les plus courantes sont constituées de xylanes dans les bois durs et graminées, dont la structure varie selon le poids moléculaire et le degré de substitution des xyloses par des unités d'arabinose, d'acide uronique et d'acide hydroxycinnamique (Monlau *et al.*, 2013).

Les principales hémicellulases sont les xylanases, tels que les endo-xylanases qui produisent des oligomères et les xyloxydases qui produisent des monomères de xylose (Jeffries, 1994), dont l'activité hydrolytique doit être complétée par l'action d'enzymes capables d'attaquer d'autres chaînes ou branchements (chaînes acétyle, arabinose, d'acide glucuronique,...). Enfin, les liaisons avec la lignine *via* les acides p-coumarique et férulique conduisent à réduire l'accessibilité des hémicelluloses (Monlau *et al.*, 2013).

IV.2.4. Lignine

La lignine est associée à la cellulose et aux hémicelluloses pour constituer le complexe lignocellulosique (Jeffries, 1994). Insoluble dans l'eau, organisée en micro et macrofibrilles, Il constitue une barrière physique dans les parois secondaires des cellules, assurant leur rigidité et imperméabilité, et protégeant les polysaccharides des agressions chimiques et biologiques (Malherbe et Cloete, 2002). Ce macropolymère est très résistant à la biodégradation (Dashtban *et al.*, 2010) du fait non seulement de sa structure physique et du complexe lignocellulosique, mais également de ses caractéristiques chimiques du polymère. En effet, les unités d'alcools phenylpropanes, unités *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) et syringyl (S), sont en proportion variable, sans répétition (Adler, 1977). En outre, ces unités sont associées par des liaisons condensées types C-C (biphényl 5-5, diarylpropane β -1, phenylcoumaran β -5, resinol β - β) et diaryl-éther (4-O-5), et des liaisons non condensées types aryl-éther (α -O-4 et β -O-4). Les liaisons β -O-4 sont la cible des techniques de dépolymérisation

de la lignine (Lapierre *et al.*, 1995), qu'ils s'agissent de prétraitements physique, chimique ou biologique.

Bien que la plupart des micro-organismes ne disposent pas de l'arsenal enzymatique pour hydrolyser la lignine, certains champignons de la pourriture blanche ont la capacité de dégrader efficacement ce polymère complexe (Wanatabe *et al.*, 2009).

IV.2.5. Accessibilité des polymères

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hydrolyse des polysaccharides nécessite l'action concertée de plusieurs exo-enzymes. Ces réactions sont des catalyses hétérogènes de dépolymérisation qui s'effectue en phase aqueuse, avec nécessité. Par conséquent, sans contact direct entre le substrat et l'exo-enzyme, l'hydrolyse ne peut pas se produire (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence de bonnes corrélations entre la surface, le volume poral et la digestibilité enzymatique des biomasses lignocellulosiques (Grethlein, 1985 ; Chang & Holtzapple, 2002 ; Sun & Cheng, 2002). L'humidification de la biomasse est favorable permet d'augmenter la surface porale (Fan *et al.*, 1980). A l'inverse, le séchage peut conduire à réduire irréversiblement la porosité et la surface porale, conduisant à limiter significativement l'accessibilité enzymatique de la cellulose et des hémicelluloses.

Cette accessibilité est également associée à la cristallinité de la cellulose et l'organisation de la lignine et de l'hémicellulose avec les micro et microfibrilles de cellulose. Par conséquent, de nombreux chercheurs ne considèrent pas l'accessibilité des polymères comme un paramètre unique qui conditionnent leur hydrolyse (Wyman, 1996). Enfin, quelques auteurs considèrent que l'accessibilité enzymatique des polymères est également limitée par l'adsorption des enzymes comme les cellulases s'adsorbant à la surface de la biomasse avant d'atteindre leur cible (Grethlein, 1985 ; Zhang & Lynd, 2004).

IV.3. Prétraitements et méthanisation

La bioconversion de la cellulose et des hémicelluloses nécessite de déstructurer le complexe lignocellulosique afin d'accroître la bioaccessibilité et ainsi la biodégradabilité de ces substrats. De nombreuses recherches sont menées depuis une trentaine d'années pour déterminer les conditions de prétraitements thermiques, physiques, chimiques et/ou biologiques de biomasses lignocellulosiques. Il existe de nombreuses revues bibliographiques sur ces techniques, les résultats prometteurs et leurs nombreux avantages et inconvénients (Sun & Cheng, 2002 ; Mosier *et al.*, 2005 ; Taherzadeh & Karimi, 2008 ; da Costa Sousa *et al.*, 2009 ; Hendriks & Zeeman, 2009 ; Kumar *et al.*, 2009 ; Mtui, 2009 ; Alvira *et al.*, 2010 ; Frigon et Guiot, 2010 ; Harmsen *et al.*, 2010 ; Mussatto & Teixeira, 2010 ; Berglund Odhner *et al.*, 2012 ; Chandra *et al.*, 2012 ; Limayen & Ricke, 2012 ; Menon & Rao, 2012 ; Monlau *et al.*, 2013). Plus rarement sont les auteurs qui ont ciblés leur synthèse bibliographique sur les prétraitements des biomasses lignocellulosiques également dans l'optique de la production de biogaz (Taherzadeh & Karimi, 2008 ; Hendriks & Zeeman, 2009 ; Frigon et Guiot, 2010 ; Berglund Odhner *et al.*, 2012 ; Chandra *et al.*, 2012 ; Monlau *et al.*, 2013). L'objectif de ce paragraphe est de présenter la synthèse des connaissances sur les techniques de prétraitement les plus couramment employées afin de favoriser la bioconversion de biomasses lignocellulosiques en biogaz. Le choix du prétraitement dépend de critères économiques et techniques. Nous aborderons uniquement les critères techniques, en

considérant de préférence les prétraitements peu énergivores et susceptibles d'être compétitifs dans le futur. Ces techniques sont généralement classées en plusieurs catégories. Nous les présenterons selon le classement suivant : prétraitements mécaniques, thermiques, chimiques, physico-chimiques et enfin biologiques.

IV.3.1. Prétraitement mécanique

La réduction de la taille des particules est appliquée comme un prétraitement mécanique pour faciliter la manutention des matériaux et pour augmenter le ratio Surface/Volume (Harmsen et al., 2010). Cette réduction peut être réalisée par broyage, concassage et déchiquetage (Palmowski & Müller, 2000). D'après ces auteurs, les opérations mécaniques conduiraient également à modifier la structure et la composition chimique des biomasses lignocellulosique. L'augmentation de la surface accessible, la baisse du degré de polymérisation, la destructuration des fibres sont des transformations de la matière très favorables à l'augmentation de l'accessibilité des substrats polysaccharidiques aux exo-enzymes. Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'augmentation du taux d'hydrolyse de la cellulose avec la réduction de la taille des particules (Delgenes et al., 2002 ; Chang & Holtzapple, 2000 ; Hartmann et al., 2009). Par voie de conséquence, la réduction de la taille des particules se traduit par une augmentation significative du potentiel biométhanogène (Delgenes et al., 2002). L'absence de production d'inhibiteurs (comme le furfural et l'hydroxyméthylfurfural HMF) est l'un des avantages de cette option de prétraitement avant bioconversion (Hendriks & Zeeman, 2009). Toutefois, d'après ces auteurs, le recours au prétraitement mécanique de la biomasse est problématique du point de vue économique, au regard de la consommation énergétique de telles opérations.

IV.3.2. Prétraitements thermiques / thermochimiques

Les prétraitements thermiques rassemblent une large gamme de technologies basées sur le principe de l'hydrolyse et de la solubilisation partielles des composés organiques à haute température. Des réactions chimiques, notamment d'oxydation, peuvent se produire. Plus précisément, les traitements sont réalisés en présence d'eau liquide à haute température (150-260°C) et pression (10-50 bars), pouvant être éventuellement dans une 2^{ème} étape détendue rapidement sous forme de vapeur (steam explosion). Le traitement par explosion à la vapeur est effectué en quelques minutes sous haute pression (10-50 bar) et haute température (180-260°C). Sans l'effet mécanique de la détente brusque sur les fibres, une plus longue durée de traitement est nécessaire à l'eau liquide sur une gamme de pression plus faible (Hendriks & Zeeman, 2009). L'hydrolyse des hémicelluloses est effective entre 150 et 180°C. Les acides organiques formés par oxydation des produits d'hydrolyse des hémicelluloses auraient pour effet de catalyser l'hydrolyse de l'hémicellulose (Gregg & Saddler, 1996). Au-delà de 180°C, la lignine peut être partiellement hydrolysée et solubilisée, avec pour conséquence indésirable le risque de formation de produits inhibiteurs, tels le furfural et l'hydroxyméthylfurfural (Berglund Odhner *et al.*, 2012). Les conséquences de tels traitements sur la bioconversion de biomasses lignocellulosique en méthane ont été encore peu étudiées. La plupart des travaux cités dans la littérature concerne la production de papier ou d'éthanol, étant donné que ces techniques ciblent la libération de la cellulose (Hendriks & Zeeman, 2009 ; Berglund Odhner *et al.*, 2012). Toutefois, le coût énergétique et le risque de produire des sous-produits inhibiteurs laissent penser que de tels prétraitements sont peu envisageables dans la filière biogaz.

IV.3.3. Prétraitement acide

Le prétraitement acide de biomasses lignocellulosiques a fait l'objet de nombreux travaux de recherche pour l'optimisation des conditions opératoires (Mosier *et al.*, 2005 ; Monlau *et al.*, 2013). Le principe est d'hydrolyser les hémicelluloses (et éventuellement la cellulose) sans dégrader la lignine qui peut donc être séparée, conduisant à augmenter très significativement la digestibilité enzymatique de la cellulose. Dans la grande majorité des études, l'hydrolyse acide est réalisée en quelques minutes avec l'acide sulfurique (H_2SO_4), l'acide nitrique (HNO_3) ou l'acide chlorhydrique (HCl), dilués (et à haute température), ou plus généralement à fortes concentrations (72% H_2SO_4 , 40% HCl). Comme pour les deux familles de prétraitements déjà discutées, cette technique présente le risque de formation de composés indésirables, voire toxiques en particulier pour les levures lors de la fermentation alcoolique (filrière bioéthanol). Son utilisation dans la filière biogaz pourrait être intéressante, au regard des résultats obtenus sur la méthanisation du xylose en présence de divers composés phénoliques et furanes, tels que la syringaldehyde, la vanilline, l'HMF et le furfural (Barakat *et al.*, 2012).

Cependant, même s'ils sont très efficaces, les acides concentrés sont toxiques, corrosifs et dangereux. Leur utilisation nécessite des réacteurs résistants à la corrosion. Leur coût nécessite leur récupération après l'hydrolyse afin d'être recyclés et réutilisés dans le procédé (Sun & Cheng, 2002).

IV.3.4. Prétraitement alcalin

Le prétraitement alcalin est l'une des techniques les plus couramment utilisées. Le traitement est généralement réalisé à basse température et pression, avec différentes bases telles que l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de potassium – potasse (KOH), l'hydroxyde de calcium - chaux (CaOH_2) ou l'ammoniaque (NH_3). Sa durée est de l'ordre de quelques heures à quelques jours. Le mécanisme de l'hydrolyse alcaline est basé sur la rupture des liaisons ester dans l'hémicellulose et d'autres composants tels que la lignine (Sun et Cheng, 2002). Contrairement au prétraitement acide, les bases sont difficilement récupérables car incorporées sous forme de sels dans la biomasse traitée (Mosier *et al.*, 2009). Le traitement alcalin conduit généralement à l'hydrolyse de la lignine et des hémicelluloses, comme observé sur la paille de blé par Chang et coll. (1998) et sur *Miscantus* par de Vrije et coll. (2002) cités par Monlau et coll. (2013). C'est l'approche traditionnelle de préparation de la pâte à papier.

IV.3.5. Prétraitement oxydant

Le prétraitement par oxydation est réalisé par un agent oxydant comme le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, l'oxygène ou de l'air. L'objectif de ce prétraitement est la délignification. Les agents oxydants sont très réactifs avec le cycle aromatique de résidus de lignine et, par conséquent, les polymères de lignine sont convertis en acides carboxyliques. Les acides ainsi formés peuvent provoquer une inhibition dans les processus de fermentation alcoolique et de méthanogenèse. Le prétraitement par oxydation affecte également les hémicelluloses, en raison de la non-sélectivité de l'oxydant, ce qui implique qu'une partie importante des hémicelluloses est perdue avant la conversion en biogaz (Berglund Odhner *et al.*, 2012).

V. Prétraitements fongiques et délignification

V.1. Les champignons lignocellulolytiques

L'utilisation des micro-organismes pour améliorer la biodégradabilité de la matière organique présente de nombreux avantages dont le faible coût en capital et la faible consommation d'énergie (Ma et al., 2011). Par ailleurs, les prétraitements fongiques de délignification sont généralement considérés comme étant plus écologiques. Toutefois, ils exigent plus de temps, la cinétique d'hydrolyse biologique étant significativement plus lente que celle de l'hydrolyse par voie chimique (Harmsen et al., 2010).

De nombreux champignons (doux, bruns et blancs) présentent les capacités de dégrader l'hémicellulose et la lignine, avec une très petite quantité de cellulose dégradée (Berglund Odhner et al., 2012). En 1863, Schacht a été le premier à mettre en évidence le rôle des champignons dans la pourriture du bois. Les travaux de Hartig (1878) (cité par Heitner et al., 2010) ont permis de comprendre le mécanisme biologique de dégradation fongique du bois, et d'identifier différents types de champignons en fonction des caractéristiques des pourritures du bois : les champignons de pourriture blanche, les champignons de pourriture brune et les champignons de pourriture tendre.

Depuis les années 80, les champignons de pourritures blanche, brune et molle ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche non seulement pour comprendre les mécanismes biologiques mais également dans un objectif de les utiliser pour le prétraitement des biomasses lignocellulosiques (Sun et Cheng, 2002; Schurz, 1978). Les champignons de pourriture brune et de pourriture molle attaquent principalement les hémicelluloses et la cellulose, tandis que les champignons de pourriture blanche sont capables de dégrader également la lignine. Les champignons de pourriture blanche sont considérés comme étant les plus prometteurs pour le prétraitement de biomasses lignocellulosiques (Sun et Cheng, 2002 ; Fan et al., 1987).

V.1.1. Les champignons de pourriture brune et de pourriture molle

Les champignons de pourriture brune hydrolysent les polymères glucidiques de biomasses lignocellulosiques, alors que leur capacité à convertir la lignine est limitée (Martinez et al., 2005). Au cours du processus de décomposition du bois, les champignons de pourriture brune dépolymérisent rapidement la cellulose. Des pertes considérables de résistance du bois se produisent très tôt dans le processus de décomposition, bien souvent avant que la colonisation fongique ne soit visuellement observable. Les composés hydrocarbonés de la structure pariétale des cellules sont largement hydrolysés, conduisant à ne laisser que son squelette ligneux. Généralement, ce type de dégradation est également désigné comme la pourriture sèche du bois (Blanchette et al., 1997).

Les champignons de pourriture tendre appartiennent généralement à deux divisions taxonomiques des champignons, les ascomycètes (champignons qui sporulent) et les deutéromycètes (champignons dont on ignore encore le mécanisme de reproduction sexuée). Globalement, ils se caractérisent par leur capacité limitée de décomposition du bois : leur métabolisme permet d'hydrolyser uniquement les composés hydrocarbonés de bois tendre, et le plus souvent en condition d'humidité élevée. Il existe deux types

de fonges de pourriture tendre : le type 1 pour lesquels la décomposition du bois se caractérise par la formation de cavités longitudinales formées dans la paroi secondaire des cellules de bois (lamelle moyenne n'est pas dégradée) et le type 2 où la dégradation de la totalité de la paroi secondaire est mise en évidence. Tout comme dans le cas de la pourriture brune, les pertes importantes de résistance de bois sont associées à la pourriture tendre, en particulier dans le cas où l'attaque fongique est visuellement observable. Au cours de la progression de la décomposition du bois, une perte importante d'hémicellulose et de cellulose se produit et les concentrations de la lignine augmentent dans le bois résiduel (Blanchette et al., 1997).

V.1.2. Les champignons de pourriture blanche

Parmi les 1700 espèces de champignons de pourriture de bois identifiés sur le continent américain, 94% sont champignons de pourriture blanche. La plupart de ces espèces ont la capacité de coloniser les bois tendres (gymnospermes), mais également les bois durs (angiospermes) qui se caractérisent par leur teneur en lignine plus faible et leur teneur en hémicellulose plus élevée. Dans la nature, la biodégradation efficace de la lignine au cours du processus de décomposition du bois serait principalement liée aux activités des fonges de pourriture blanche. Les champignons de pourriture blanche sont classés en deux catégories : les champignons non sélectifs et les champignons sélectifs. Les deux catégories de champignons de pourriture blanche peuvent agir conjointement dans la décomposition de bois (Heitner *et al.*, 2010).

Les champignons de pourriture blanche **non sélectifs** attaquent simultanément l'ensemble des composants de la paroi cellulaire, y compris la lignine. Ils constituent un groupe d'espèces très hétérogène non seulement du point de vue taxonomique mais également sur leur capacité à hydrolyser l'hémicellulose, la cellulose et la lignine.

Les champignons de pourriture blanche **sélectifs** dégradent préférentiellement la lignine constitutive de la paroi cellulaire, en laissant des concavités blanches, cellules dégradées constituées de cellulose. C'est le cas de plusieurs espèces actuellement très étudiées pour leur sélectivité vis-à-vis de la lignine : *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia spp.*, *Physisporinus rivulosus* et *Squalens dichomitrus*.

Les dégradeurs sélectifs de la lignine peuvent avoir des applications biotechnologiques potentielles importantes lorsque l'élimination de la lignine est nécessaire, comme dans les processus de biopulpage pour la fabrication de la pâte à papier, et également dans les procédés de production de biocarburants.

De nombreux travaux de recherche portent sur l'étude du comportement des champignons de pourriture blanche, en particulier sur leur capacité à dégrader, plus ou moins sélectivement, la lignine constitutive de la biomasse lignocellulosique en vue de bioconversion des polysaccharides en méthane ou éthanol (Amirta *et al.*, 2006 ; Wan & Li, 2012). En effet, une étape de prétraitement fongique doit permettre de rendre ces polymères plus facilement accessibles aux enzymes hydrolytiques tout en évitant de les biodégrader au cours de cette étape car une perte trop importante d'hémicellulose et(ou) de cellulose conduirait à abaisser le potentiel méthanogène. Parmi les nombreuses études publiées ces dernières années sur le prétraitement fongique de biomasses lignocellulosiques, certaines d'entre elles sont résumées dans le Tableau 9.

Ces études sont réalisées plus généralement sur biomasses résiduelles agricoles pour l'étude du comportement d'espèces (et souches) isolées faisant partie des champignons de pourriture blanche, avec caractérisation des biomasses avant et après incubation en présence des fonges afin de mettre en

évidence l'évolution de la structure et de la composition biochimique. Parmi celles citées dans le Tableau 9, l'étude de Zhang et coll. (2007) a porté sur la sélection de 34 isolats de champignons de la pourriture blanche ont été sélectionnés pour le prétraitement biologique des tiges de bambou *Phyllostachys pubescence*. Deux espèces, *Echinodontium taxodii* 2538 et *Trametes versicolor* G20, ont ainsi pu être sélectionnées pour leur capacité à réduire de plus de 20% la teneur en lignine contenu dans les tiges de bambou. Le rendement de production de sucres fermentescibles par hydrolyse enzymatique réalisée après prétraitement fongique augmente significativement pour les deux espèces, et dépend de la durée du prétraitement.

Par ailleurs, de nombreuses études ont permis de confirmer que plusieurs espèces de pourritures blanches dégradent à la fois la lignine et les polysaccharides pariétaux. C'est le cas des travaux de Taniguchi et coll. (2005) sur 4 espèces de champignons de pourriture blanche, dont *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor* qui dégradent respectivement 21% et 37% de lignine, ainsi que 49% et 58% de la cellulose initialement présente de paille de riz. De même, Tuyen et coll. (2013) ont étudié la délignification et la disponibilité des éléments nutritifs de 11 types de champignons de pourriture blanche sur paille de blé. Ces résultats ont montré que le ratio de la perte de lignine sur celle de hémicellulose est fortement corrélé avec l'augmentation de production de gaz ($r^2 = 0,87$). Si la délignification est fortement corrélée à la dégradation de l'hémicellulose ($r^2 = 0,96$), la corrélation entre la perte de lignine et celle de la cellulose est faible ($r^2 = 0,41$). Cette observation indique que la délignification de la paille de blé est inévitablement accompagnée par la dégradation de l'hémicellulose.

Tableau 9 : Effets du prétraitement de biomasses lignocellulosique par des champignons de pourriture blanche.

Substrat	Champignon pourriture de blanche	Prétraitement complémentaire	Effet	Réf.
			Rendement méthane :	
Cèdre janonais	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (56 jours)	-	25 %, basé sur la masse de bois non traité ; 35 %, basé sur la masse de holocellulose traitée	Amirta <i>et al.</i> (2006) (Amirta et al., 2006)
Bambou	<i>Echinodontium taxodii</i> 2538 (28 jours)	-	24.28% de réduction de lignine	Zhang et al. (2007) (Zhang et al., 2007)
Bambou	<i>Trametes versicolor</i> G20 (28 jours)	-	24.42% de réduction de lignine	Zhang et al. (2007) (Zhang et al., 2007)
Bambou	<i>Echinodontium taxodii</i> 2538 (30 jours)	-	29% de réduction de lignine	Zeng et al. (2012)(Zeng et al., 2012)

Bambou	<i>Irpex lacteus</i> CD2 (30 jours)	-	13% de réduction de lignine	Zeng et al. (2012)(Zeng et al., 2012)
Blé (paille)	Euc-1 (46 jours)	-	Bioaccessibilité de la cellulose : x4 (test enzymatique)	Dias et al. (2010) (Dias et al., 2010)
Blé (paille)	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (18 jours) (après)	extraction à l'eau chaude (85°C, 10min)	Rendement d'extraction des sucres : 20% (champignon), 43% (extraction à l'eau chaude + champignon)	Wan et Li. (2011) (Wan & Li, 2011a)
Blé (paille)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> + Mn, Mg, Fe, Zn, Cu (7 jours)	-	<u>rendement en sucre</u> : x3,5, (test enzymatique)	Zeng et al. (2011) (Zeng et al., 2011)
Riz (paille)	<i>Pleurotus ostreatus</i> (60 jours)	-	rendement en glucose 32 %, basé sur la masse de cellulose de paille non traitée ; Klason lignine dégradée :41% ; cellulose résiduelle: 83% ; hémicellulose résiduelle: 52%	Taniguchi et al. (2005) (Taniguchi et al., 2005)
Sorgho (tige)	<i>Cyathus stercoreus</i> (42 jours)	-	Biodégradabilité : Réduction 10.5%	Akin et al. 1996(Akin et al., 1996)
Sorgho (gaine)	<i>Cyathus stercoreus</i> (42 jours)	-	Biodégradabilité : Réduction 17.1%	Akin et al. 1996(Akin et al., 1996)
Sorgho (feuille)	<i>Cyathus stercoreus</i> (42 jours)	-	Biodégradabilité : augmentation 37.9%	Akin et al. 1996 (Akin et al., 1996)
Maïs (tige)	<i>Cyathus stercoreus</i> (42 jours)	-	Biodégradabilité : augmentation 20%	Akin et al. 1996 (Akin et al., 1996)
Blé (tige)	<i>Cyathus stercoreus</i> (42 jours)	-	<u>Biodégradabilité</u> : augmentation 1.5 fois	Akin et al. 1996 (Akin et al., 1996)

Blé (gaine)	<i>Cyathus stercoreus</i> (42 jours)	-	Biodégradabilité : augmentation 19.3%	Akin et al. 1996 (Akin et al., 1996)
Blé (feuille)	<i>Cyathus stercoreus</i> (42 jours)	-	Biodégradabilité : Réduction 1.8%	Akin et al. 1996 (Akin et al., 1996)
Blé (paille)	<i>Trametes versicolor</i> (Tv 2) (21 jours)	-	Saccharification enzymatique : augmentation 91%	(Pinto et al., 2012)
Blé (paille)	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (50 jours)	-	Réduction de 60% de teneur d'ADL	Tuyen et al. (2012)(Tuyen et al., 2012)
Bois (Cèdre japonais)	<i>Phellinus SKM2102</i> sp. (56 jours)	ethanolysis	Saccharification enzymatique : augmentation 131%	(Baba et al., 2011)
Ananas (feuille)	<i>Ganoderma lucidum</i> (5 jours)		Réduction de lignine : 15%	(Hariharan & Nambisan, 2012)
Maïs (tige)	<i>Irpex lacteus</i> CD2 (15 jours)	Traitement alcalin	Digestibilité enzymatique : augmentation 14%	Yu et al. (2010) (Yu et al., 2010)

V.2. Mécanismes de délignification par les champignons de pourriture blanche

V.2.1. Généralités

Dans la nature, la biodégradation de la lignine au cours du processus de décomposition du bois serait principalement liée aux activités des fonges de pourriture blanche, sélectifs ou non. La dégradation de la biomasse lignocellulosique par ces fonges est réalisée par un pool enzymatique complexe constitué de cellulases, d'hémicellulases et de ligninases, associés à la complexité biochimique et structurale de la biomasse lignocellulosique. De nombreux micro-organismes sont capables de dégrader la cellulose et d'autres polymères de la paroi cellulaire de la plante. Plus de 14 000 espèces de fonges exprimant cette capacité ont été isolées. Mais seulement quelques dizaines d'entre elles ont été soumises à des expérimentations approfondies.

Au cours de la dégradation sélective de la lignine, des enzymes fongiques hydrolysent partiellement la lignine et les polysaccharides non cellulosiques sans dégradation significative de la cellulose. Parmi les enzymes dites « ligninolytiques », deux peroxydases, la **lignine peroxydase** (LiP) et la **manganèse peroxydase** (MnP) et une phénol oxydase couplée avec le cuivre, la **laccase**, sont considérées comme les principales enzymes responsables de la dépolymérisation de la lignine (Sanchez, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Wan & Li, 2010).

Ces enzymes, de poids moléculaires élevés, ne peuvent pas pénétrer au travers de la structure pariétale des cellules végétales. Elles sont actives à la surface de la paroi cellulaire et peuvent induire la formation d'agents de faibles poids moléculaires, tels que des radicaux libres qui peuvent diffuser à travers la paroi cellulaire. L'expression des systèmes ligninolytiques dépend beaucoup de la structure de la lignine et des conditions de culture (Wan & Li, 2012; Wan & Li, 2010). Dashtban et coll. (Dashtban et al., 2010) ont résumé les principaux mécanismes ligninolytiques des champignons de pourriture blanche de l'embranchement des basidiomycètes, illustrés dans la Figure 14 ci-dessous :

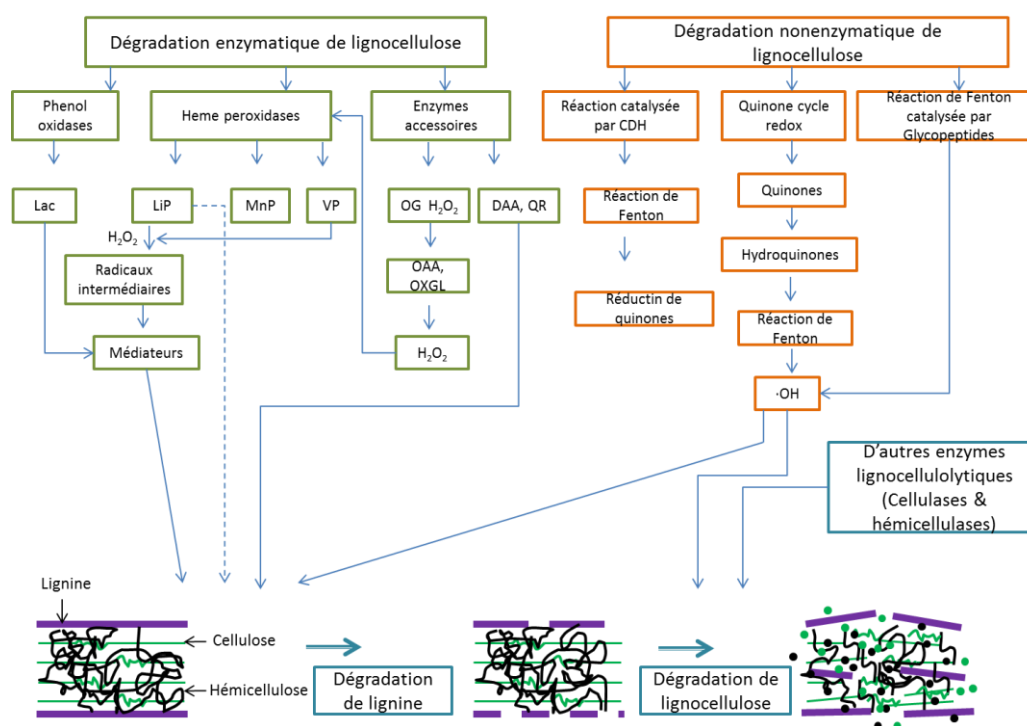


Figure 14 : Dégradation de lignine par champignons de pourriture blanche du phylum Basidiomycète. Schéma adapté de (Dashtban et al., 2010).

V.2.2. Les enzymes extracellulaires de la délignification

Les champignons dégradent la lignine en sécrétant des enzymes communément dénommés « ligninases ». Les ligninases sont classées comme **oxydases phénoliques (laccases** qui sont des phénol-oxydases couplées avec le cuivre) ou bien **hème peroxydases** (lignine peroxydase (**LiP**), le manganèse peroxydase (**MnP**) et la peroxydase polyvalent (**VP**)) (cf. Tableau 10). En général, les laccases utilisent l'oxygène O_2 comme oxydant alors que les peroxydases utilisent du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Dashtban *et al.*, 2010). Les champignons de pourriture blanche sécrètent diversement une ou plusieurs enzymes de modification de la lignine (LMEs) en plus d'autres composés nécessaires à la dégradation efficace de la lignine (Wesenberg *et al.*, 2003). Par exemple, l'enzyme génératrice de H_2O_2 , la glyoxal oxydase (GLOX). Les basidiomycètes de pourriture blanche, tels que *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*, sont parmi les espèces fongiques qui dégradent le plus efficacement la lignine (Dashtban *et al.*, 2010). Bien que la LiP soit capable d'oxyder la partie non phénolique de la lignine (qui constitue 80 à 90 % de la composition de la lignine), cette enzyme n'est généralement pas produite par de nombreuses espèces fongiques dégradant la lignine (Mondero *et al.*, 2003). En outre, des études de microscopie électronique des premiers stades de la dégradation fongique du bois ont montré que les enzymes ligninolytiques oxydantes sont trop grandes pour pénétrer dans les micropores des parois cellulaires du bois (Wang *et al.*, 2008). Ainsi, il a été suggéré que, préalablement à l'attaque enzymatique, les composés d'oxydation réactifs à faible poids moléculaire (O_2 , H_2O_2 etc.) doivent causer des modifications de structure de la lignine (Srebotnik *et al.*, 1988 ; Wang *et al.*, 2008). La Figure 14 résume les principales étapes et les enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine par les champignons de pourriture blanche.

Tableau 10 : Caractéristiques des principaux groupes des enzymes ligninolytiques fongiques (d'après Dashtban et al., 2010).

Type d'enzymes	Réaction	Cofacteur	Métal ou ion	Médiateur	Sous-unité et poids moléculaire (KDa)
Laccase	4 benzène diol + O ₂ = 4 benzosemiquinone + 2 H ₂ O	N/A	Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , H ₂ O ₂ , Imidazole, K ⁺ , K ₂ SO ₄ , Mn ²⁺ , Na ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄	Phénols, aniline, 3-HAA, NHA, syringaldéhyde, hydroxybenzotriazole et ABTS	Monomérique (40-100), dimérique, trimérique et oligomérique
Hème-peroxydases					
Lignine peroxydase (LiP)	1,2-bis (3,4-diméthoxyphényl) propane-1,3-diol + H ₂ O ₂ = 3,4-diméthoxybenzal déhyde + 1-(3,4-diméthoxyphényl) éthane-1,2-diol + H ₂ O	Hème	Fe	Ethanol de veratryl	Monomérique (37-50)
Manganèse peroxydase (MnP)	2 Mn(II) + 2H ⁺ + H ₂ O ₂ = 2 Mn(III) + 2H ₂ O	Hème	Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Mn ²⁺ , Sm ³⁺	Acides organiques comme chélateurs, thiols, acides gras non-saturés	Monomérique (32-62,5)
Versatile peroxydase (VP)	Donneur + H ₂ O ₂ = donneur oxydé + 2H ₂ O	Hème	Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe	Ethanol de veratryl, composés similaires aux médiateurs de LiP et MnP	Monomérique

a. Les enzymes type phénol oxydase (laccases)

Hydroquinone : oxydoréductases d'oxygène, CE 1.10.3.2

Les laccases sont des oxydoréductases glycosylées bleues multi-cuivre (BMCO) qui utilisent la molécule d'oxygène pour oxyder les molécules organiques par un mécanisme catalytique de réaction radicalaire (*cf.* Tableau 10) (Claus, 2004 ; Tanaka *et al.*, 1999). Les laccases couplent la réduction du dioxygène avec l'oxydation d'une grande variété de substrats aromatiques et tels que polyphénols, des monophénols méthoxy-substitué, et les amines aromatiques (Archibald et al., 1997; Thurston, 1994) (*cf.* Figure 15). L'action des laccases peut être étendue à des sous-unités non-phénoliques de la lignine par l'inclusion d'un médiateur tel que le 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (*cf.* Figure 16). L'alcool vératrylique est oxydé pour vératraldéhyde et dimères de β-1 et β-O-4

modèles non-phénoliques sont clivés ou oxydés à la position C α par le couple laccase-ABTS (Archibald et al., 1997; Bourbonnais & Paice, 1990). Le mécanisme oxydatif de la lignine par les laccases est basé sur la formation de médiateurs, les radicaux libres (*cf.* Figure 14). De faible dimension, les médiateurs ainsi générés peuvent agir non seulement à la surface mais également dans la structure lignocellulosique et oxyder une large gamme de substrats avec haut potentiel redox (Higuchi, 1989; Kawai *et al.*, 1988).

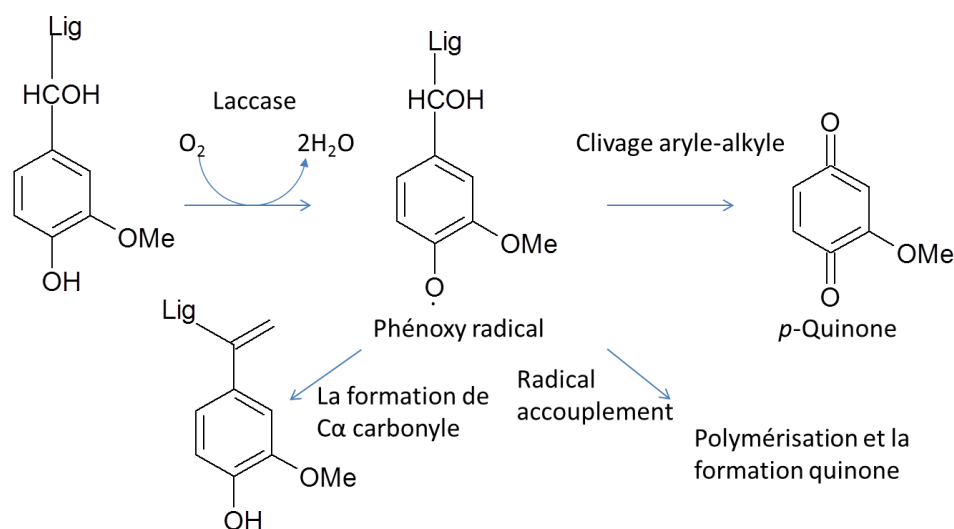


Figure 15 : Oxydation de groupes phénoliques par laccase (Archibald et al., 1997; Higuchi, 1989).

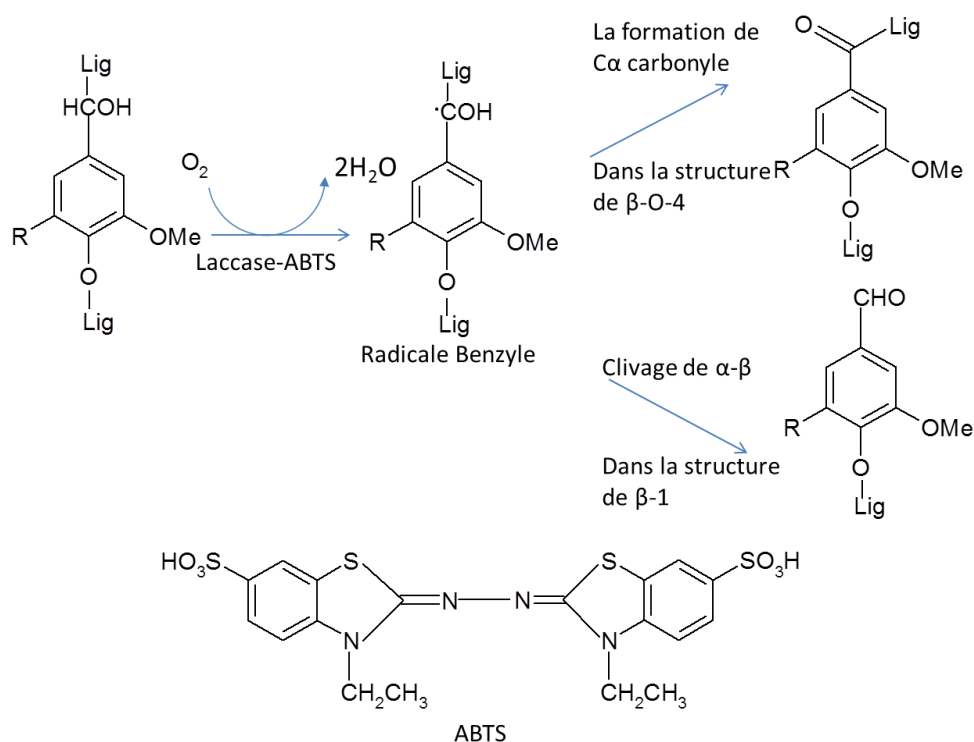


Figure 16 : Oxydation de groupes non-phénolique par laccase et ABTS (Archibald et al., 1997; Bourbonnais & Paice, 1990).

b. Les enzymes type Lignine peroxidase (LiP)

1,2-bis (3,4- diméthoxyphényl) propane - 1,3-diol : oxydoréductases peroxyde d'hydrogène, CE 1.11.1.14

Les LiPs sont des glycoprotéines contenant un hème, qui jouent un rôle central dans la biodégradation de la lignine (Mayer and Staples, 2002). Ces enzymes catalysent les dépolymérisations oxydatives d'une variété de composés de lignine non phénoliques (diarylpropane), β -O-4 des composés modèles de la lignine non- phénoliques et une large gamme de composés phénoliques (par exemple le gaïacol, alcool vanillylique, le catéchol, l'acide syringique, l'acteosyringone) à hauts potentiels d'oxydo-réduction qui sont H_2O_2 dépendantes (*cf.* Tableau 10 et Figure 17). Les lignine peroxydases oxydent les substrats dans des transferts d'électrons multi-étapes et forment des radicaux intermédiaires, tels que des radicaux phénoxy et des cations radicaux alcool vétratyrique (*cf.* Figure 14). Ces radicaux intermédiaires subissent des réactions non enzymatiques telles que le couplage radicalaire et la polymérisation, le clivage de la chaîne latérale, la méthylation et l'addition intramoléculaire et le réarrangement. Contrairement aux manganèse-peroxydases (MnP), les LiP ne nécessitent pas la participation de médiateurs grâce à leurs potentiels redox particulièrement élevés (Moredo *et al.*, 2003 ; Wong *et al.*, 2009).

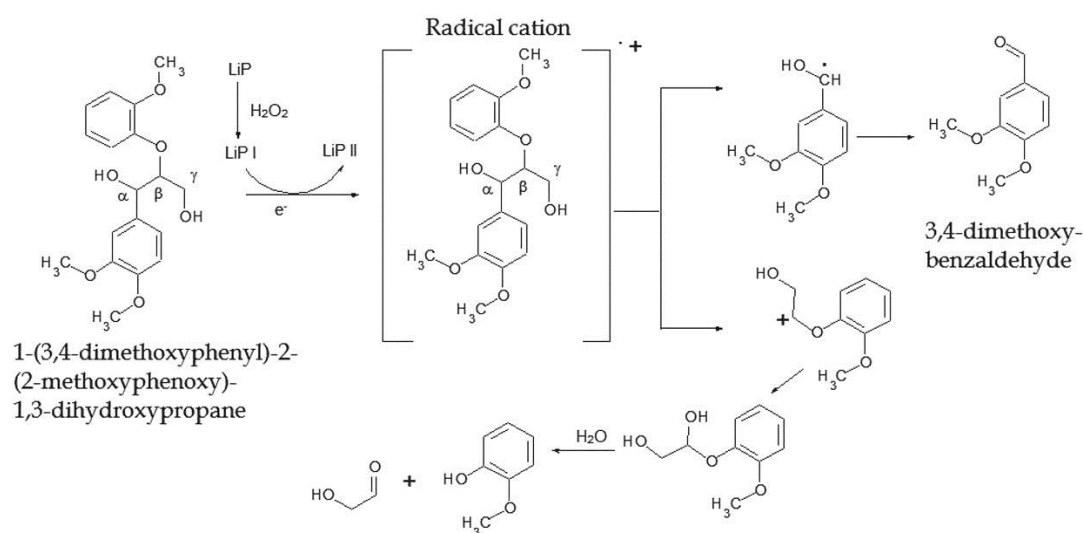


Figure 17. Oxydation du composé modèle non-phénolique-O-4 de lignine catalysée par LiP d'après Wong et al (2009).

c. Les enzymes type Manganèse peroxydase (MnP)

Les enzymes manganèse peroxydase (MnPs) sont des glycoprotéines extracellulaires découvertes il y a 30 ans chez *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn & Gold, 1985; Hofrichter, 2002; Kuwahara *et al.*, 1984). Elles sont constituées d'hème de protoporphyrine de fer qui catalyse l'oxydation de Mn (II) (le substrat réducteur) en Mn (III) qui peut ensuite oxyder les cycles phénoliques en radicaux phénoxy jusqu'à la minéralisation complète (Piontek *et al.*, 2001). Le mécanisme de catalyse de MnP étudié en détails (Heitner *et al.*, 2010; Wariishi *et al.*, 1988) est décrit dans la Figure 18.

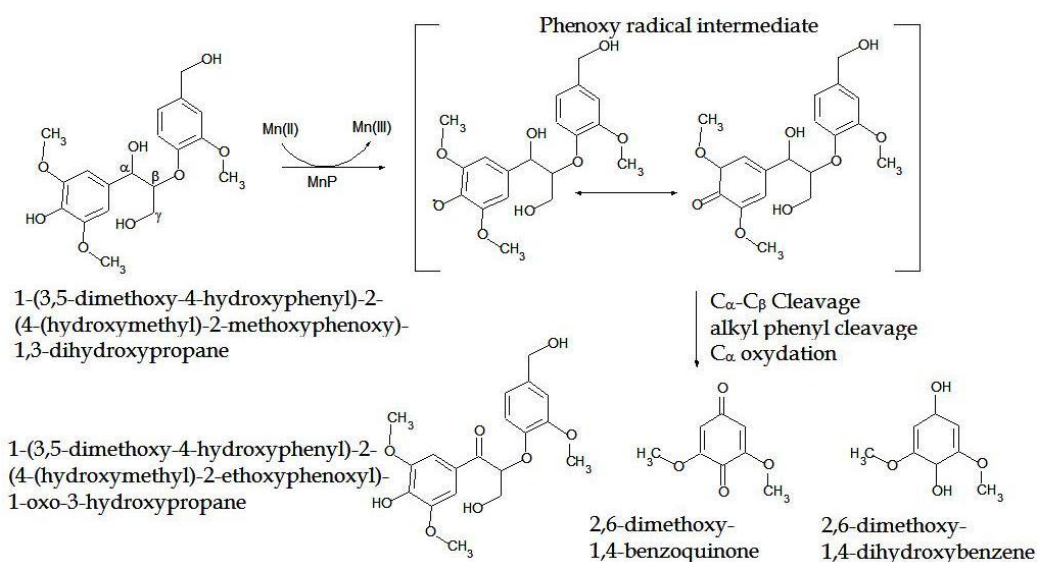


Figure 18 : Oxydation catalysée par MnP du composé de modèle phénolique de l'éther aryglycerol-aryle de la lignine d'après Wong (2009).

Très réactif, le Mn (III) est généralement présent sous la forme de complexes avec des acides organiques (lactate, oxalate, malonate). Le potentiel d'oxydation de Mn (III) chélaté est limité à des structures phénoliques de la lignine. L'oxydation de substrats non phénoliques par Mn (III), nécessite la présence de co-oxydants (*cf.* Figure 18 d'après Hofrichter, 2002). Les radicaux formés sont des radicaux d'acide acétique, $\text{COOH} \cdot \text{H}_2$, les radicaux peroxy ($\text{COOH} - \text{CH}_2\text{OO} \cdot$), le superoxyde ($\text{O}_2 \cdot^-$) et les radicaux formate ($\text{CO}_2 \cdot^-$) (Piontek, *et al.*, 2001). Chez les fonges dépourvus oxydases génératrices H_2O_2 (et dont en absence de H_2O_2), ces radicaux peuvent être utilisées par MnP en tant que sources de peroxydes et accroître leur efficacité ligninolytique (Asgher *et al.*, 2008).

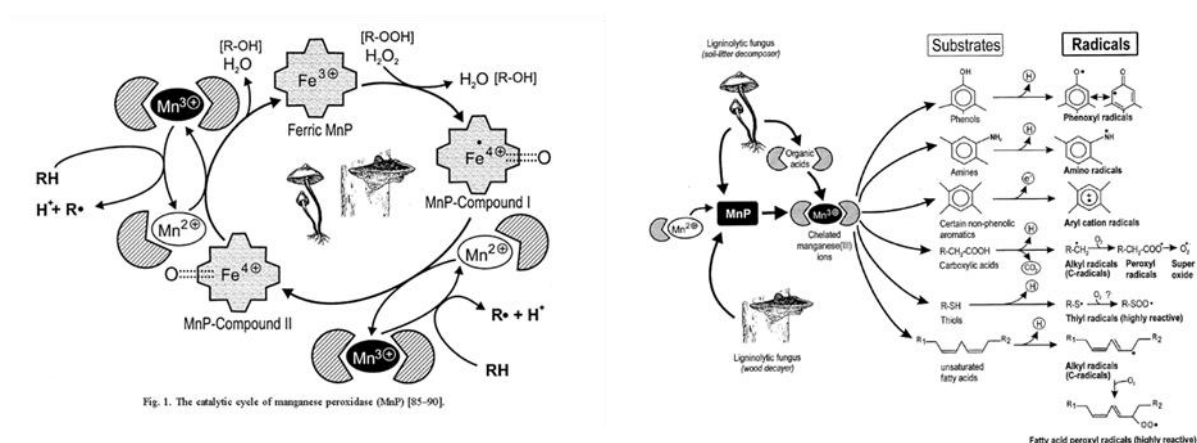


Figure 19 : Cycle catalytique de la peroxydase du manganèse (MnP) et la formation de radicaux par le système de la peroxydase du manganèse en présence de différents substrats d'après Hofrichte (2002).

d. Les enzymes type Peroxydase Versatile (VP)

Les enzymes type peroxydase versatiles (VPs) sont des glycoprotéines ayant des propriétés hybrides capables d'oxyder des substrats typiques des autres basidiomycètes peroxydases notamment Mn (II) et également de l'alcool vératrylique (VA), les substrats typiques de MnP et LiP, respectivement (Hofrichter *et al.*, 1998 ; Piontek *et al.*, 2001 ; Wesenberg *et al.*, 2003). Les enzymes VP forment

donc un groupe enzyme ligninolytique très intéressant grâce à leur aptitude d'oxydation double pour oxyder Mn (II) ainsi que des composés aromatiques phénoliques et non phénoliques (cf. Tableau 10). Il a été constaté que les VP peuvent également oxyder efficacement les composés avec un potentiel redox élevé comme le colorant Reactive Black 5 (RB5) ainsi que d'une grande variété de phénols, y compris l'hydroquinone (Gomez-Toribio *et al.*, 2001 ; Ruiz-Duenas *et al.*, 2009). Ainsi, les VP peuvent oxyder des substrats couvrant une large gamme de potentiel. Cette propriété est liée à leurs structures moléculaires hybrides qui fournissent de multiples sites de liaisons pour les substrats. Cela rend les VP plus efficaces que les LiPs et MnPs, qui ne sont pas capables d'oxyder des composés phénoliques de manière efficace sans la présence d'alcool véricatrylique ou de Mn (II), respectivement. Similaire au mécanisme MnP, Mn (III) est libéré par VP et agit comme un oxydant diffusible de la lignine phénolique et de substrats phénoliques libres (cf. Figure 14).

e. Autres enzymes ligninolytiques et enzymes accessoires

En plus des ligninases, d'autres enzymes extracellulaires fongiques agissant comme des enzymes auxiliaires ont été mises en évidence dans le processus métabolique de la dégradation de la lignine. Ceux-ci comprennent les oxydases générant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) nécessaire aux peroxydases et aux déshydrogénases responsables de la réduction des composés dérivés de la lignine (Martinez *et al.*, 2005). Les oxydases générant H_2O_2 comprennent l'aryl-alcool oxydase (AAO) (EC 1.1.3.7) mises en évidence chez plusieurs espèces, telle que *Pleurotus eryngii*, et l'enzyme glyoxal-oxydase (GLOX, une protéine « copperradical ») trouvé chez *P. chrysosporium*. En outre, des déshydrogénases aryl-alcool (DAA, une flavoprotéine) et les réductases quinone (QR) sont également impliqués dans la dégradation de la lignine par des champignons (cf. Figure 14). Par ailleurs, il a été montré que la cellobiose déshydrogénase (CDH), qui est produite par de nombreux champignons dans des conditions différentes cellulolytiques, est également impliquée dans la dégradation de la lignine en présence de H_2O_2 et des ions Fe chélatés (Guillen *et al.*, 1997). La CDH participerait à la dégradation de la lignine par la réduction des quinones, qui peuvent être utilisées par des enzymes ligninolytiques ou par une réaction de Mn-peroxydase (cf. Figure 14).

V.2.3. Autres mécanismes de délignification

Des processus oxydatifs généralement associés à la génération de radicaux hydroxyles libres ($\cdot OH$, cf. Figure 14) ont été rapportés par plusieurs auteurs chez de nombreux champignons de pourriture blanche et brune (Dashtban *et al.*, 2010; Guillén *et al.*, 1992). L'action de ces radicaux facilite celles des enzymes lignocellulolytiques (Call & Mücke, 1997; Dashtban *et al.*, 2010). Les radicaux libres $\cdot OH$ peuvent réagir avec les composés non phénoliques de la lignine, conduisant à la déméthoxylation et l'introduction concomitante de sites phénoliques au composé non phénolique modèle. Cette réaction est importante, car l'insertion de groupes phénoliques rend plus facile l'oxydation de la lignine (Henriksson *et al.*, 2000a; Henriksson *et al.*, 2000b; Hildén *et al.*, 2000; ten Have & Teunissen, 2001).

Cellobiose déshydrogénase. La production fongique de radicaux $\cdot OH$ libres est catalysée notamment par la cellobiose déshydrogénase (CDH) (Baldrian & Valášková, 2008; Dashtban *et al.*, 2010). Cette enzyme est un flavocytochrome extracellulaire sécrété par les champignons de pourritures brune et blanche (Harreither *et al.*, 2011; Zamocky *et al.*, 2006). Le mécanisme actuellement considéré est la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton liée à la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et à la production de H_2O_2 (Harreither *et al.*, 2009; Hyde & Wood, 1997; Kremer & Wood, 1992).

Production d'agents chélatants. Les fonges de pourriture blanche et brune produisent des chélatants de faible poids moléculaire qui sont capables de pénétrer dans la paroi de la cellule végétale. Par exemple, *Gloeophyllum trabeum* produit un peptide qui peut dégrader la cellulose en fibres courtes par une réaction oxydative (Call et Mücke, 1997 ; Baminger *et al.*, 2001). Certains de ces chélatants sont des quinones, qui doivent d'abord être convertis en hydroquinones par des enzymes particulières (*cf.* Tableau 11) avant que les radicaux hydroxyles libres puissent être produits par la réaction de Fenton (*cf.* Figure 14) (Moredo *et al.*, 2003).

Des glycopeptides de masses moléculaires comprises entre 1,5 et 12 kDa capables de catalyser des réactions d'oxydo-réduction et de produire ainsi des radicaux hydroxyles libres ont été mis en évidence dans les cultures de champignon de pourriture brune, tel que *G. trabeum* (Takashi *et al.*, 2002) et les fonges de pourriture blanche, tels que *P. chrysosporium* (Srebotnik *et al.*, 1988 ; Enoki *et al.*, 1992).

Tableau 11 : Mécanismes et enzymes impliquées dans la production de \bullet OH chez différentes espèces fongiques

Champignon	Mécanisme	Autres enzymes impliquées/leur fonction
Fonges de pourriture blanche (e.g. <i>D. squalens</i>)	Réaction catalysée par CDH	Oxalate décarboxylase/médiation de la concentration de l'oxalate
Fonges de pourriture blanche et brune (e.g. <i>C. puteana</i> , <i>P. Chrysosporium</i>)	Cycle redox de quinone	Benzoquinone reductases, CDH, déshydrogénases des sucres/convertir quinones en hydroquinones
Fonges de pourriture blanche et brune (e.g. <i>F. palustris</i> , <i>P. Chrysosporium</i>)	Réaction de Fenton catalysée par les glycopeptides	

V.3. Métabolisme de *Ceriporiopsis subvermispora*

V.3.1. Généralités

Ceriporiopsis subvermispora est un fonge de pourriture blanche de la famille des *Phanerochaetaceae* de la division de Basidiomycètes qui dégrade spécifiquement la lignine et les hémicelluloses, en absence d'un système complet cellulolytique. Cette espèce présente donc un profil métabolique qui justifie son étude depuis une trentaine d'années en vue de son utilisation en biopulping dans l'industrie papetière (Blanchette *et al.*, 1997; Messner & Srebotnik, 1994; Vicentim & Ferraz, 2007) et, plus récemment, pour le développement de prétraitements biologiques de biomasses lignocellulosiques dédiés à la bioconversion de la cellulose en éthanol ou méthane, comme nous le verrons par la suite.

Ceriporiopsis subvermispora est capable de cliver la liaison de β -O-4 aryl éther entre unités de lignine sans attaquer significativement la cellulose à un stade précoce de la pourriture du bois (Amirta *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2003). *C. subvermispora* a donc une sélectivité élevée, en particulier dans la dégradation des composés aromatiques tels que les acides phénoliques à liaison ester (Akin *et al.*, 1993; Wan & Li, 2010).

C. subvermispora produit deux enzymes phénol oxydases : la manganèse peroxydase (MnP) prédominante, et une laccase (Lobos et al., 1994; Tanaka et al., 2009). Il manque un système enzymatique complet cellulolytique pour ce champignon (Harreither et al., 2009; Sethuraman et al., 1998). Des études ont été effectuées sur les enzymes cellulolytiques. Endoglucanases, β -glucosidases ont été détectés dans les extraits enzymatiques de culture état solide de *C. subvermispora* cultivés sur bois (Guerra et al., 2003; Heidorne et al., 2006; Magalhães et al., 2006), cellobiose déshydrogénase dans la culture de *C. subvermispora* cultivé dans le milieu liquide à base de cellulose et levure (Harreither et al., 2009).

V.3.2. Utilisation de *Ceriporiopsis subvermispora* pour le prétraitement de biomasses lignocellulosiques

Ceriporiopsis subvermispora a une sélectivité élevée vis à vis de la lignine, qu'il dégrade préférentiellement en laissant presque intacte la cellulose (Sasaki et al., 2011). Ce champignon a été largement utilisé dans le processus de traitement biologique sur les résidus lignocellulosiques pour augmenter la production d'éthanol (Sasaki et al., 2011) et la production de méthane (Amirta et al., 2006), ou pour optimiser le biopulping (Yaghoubi et al., 2008). Les effets de prétraitement par ce champignon sur les caractéristiques biochimiques de biomasses lignocellulosiques ont été résumés dans le Tableau 12 suivant.

Tableau 12 :

Souche	de	Substrat	Durée d'incubation (semaine)	% réduction	Effet
Ceriporiopsis subvermispora ATCC 90467		Bagasse (Sasaki et al., 2011)	8	20.4(lignine) 15.0(holocellulose)	44.9/100g/g(sugar) 35.8%(éthanol) 27.0%(éthanol sans fungi)
ATCC 96608		Rafle de maïs (Wan & Li, 2010)	6 (2.6-6)	39.2 lignine <5(cellulose) 27(hemicellulose)	57-67%(glucose) 22%(sans champignon)
ATCC 96608		Panic raide (Wan & Li, 2011b)	2.6(18j)	>26(lignine) 15(hémicellulose) <5(cellulose) <3(lignine et hémicellulose) contrôle	37.15% of the theoretical(glucose)
ATCC 96608		Bois dur (Wan & Li, 2011b)	2.6(18j)	17(lignine) 17(hémicellulose)	24.21% of the theoretical(glucose)
CBS 347.63		Bois dur (Beech) (Tanaka et al., 2009)	12	16.6% (cellulose) 17.8% (hémicellulose) 36.5% (lignine)	
CBS 347.63		Bois tender (Cèdre) (Tanaka et al., 2009)	12	11% (cellulose) 41.9% (hémicellulose) 27.9% (lignine)	
CZ-3-8497		Tige de sorgho (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 66.1%
FP-90031-sp		Tige de sorgho (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 51.6%

CZ-3-8497	Gaine de sorgho (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 42.4%
FP-90031-sp	Gaine de sorgho (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 32.2%
CZ-3-8497	Feuille de sorgho (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 87.1%
FP-90031-sp	Feuille de sorgho (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 85.4%
CZ-3-8497	Tige de maïs (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 17.5%
FP-90031-sp	Tige de maïs (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 7.5%
CZ-3-8497	Tige de paille (Akin et al., 1996)	6	-	<u>Biodégradabilité :</u> augmentation 2.4 fois
FP-90031-sp	Tige de paille (Akin et al., 1996)	6	-	<u>Biodégradabilité :</u> augmentation 1.9 fois
CZ-3-8497	Gaine de paille (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 32.8%
FP-90031-sp	Gaine de paille (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : augmentation 31.5%
CZ-3-8497	Feuille de paille (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : réduction 0.1%
FP-90031-sp	Feuille de paille (Akin et al., 1996)	6	-	Biodégradabilité : réduction 6.5%

Les effets de *Ceriporiopsis subvermispora* ou d'autres espèces de champignons de pourriture blanche sur la structure des biomasses lignocellulosiques ont été étudiés par plusieurs techniques telles que IRTF, DRX, analyse calorimétrique différentielle et thermogravimétrique couplées (ATG-DSC), thioacidolyse, microscopie électronique à balayage (MEB), etc..

VI. Conclusions et organisation du plan expérimental

Cette étude bibliographique a permis de mettre en évidence la diversité et la complexité des biomasses lignocellulosiques et les difficultés associées en termes de potentiel de bioconversion en méthane. L'objectif de cette thèse est, dans un premier temps, d'évaluer l'influence des caractéristiques d'une large gamme de substrats lignocellulosiques sur leur biodégradabilité anaérobie en déterminant les corrélations entre les caractéristiques bio-physico-chimiques et le potentiel biométhanogène. Dans un second temps, les effets du prétraitement fongique par *Ceriporiopsis subvermispora* sur plusieurs biomasses lignocellulosiques présélectionnées sont évalués dans un objectif de mettre en évidence l'efficacité du fonge selon les caractéristiques des matrices et, de mieux comprendre leur influence sur les caractéristiques des matrices.

Atteindre à ce but conduit à la réalisation de plusieurs séries d'expériences :

- Caractériser 36 biomasses lignocellulosiques représentatives des ressources disponibles et susceptibles d'être mobilisées pour la filière méthanisation (résidus agricoles et sylvicoles, composts, fractions de déchets municipaux, biodéchets, résidus de déchets municipaux). Etudier leur biodégradabilité anaérobie et les corrélations entre leurs caractéristiques bio-physico-chimiques et leur potentiel de biométhane. Les caractéristiques bio-physico-chimiques comprennent : compositions de fibre, demande biologique et chimique d'oxygène, demande chimique d'oxygène soluble, carbone organique totale et soluble. Examiner les corrélations entre les caractéristiques et le potentiel de biométhane.
- Sélectionner 14 biomasses lignocellulosiques (résidues agricoles et sylvicoles) parmi les 36 biomasses préalablement caractérisées et compléter leur caractérisation avec trois nouvelles techniques : hydrolyse enzymatique pour déterminer l'accessibilité de la cellulose, hydrolyse acide pour mesurer de l'autre façon les compositions en polysaccharides et lignine, et analyse élémentaire. Evaluer les corrélations entre les neuf caractéristiques et le potentiel biométhane.
- Sélectionner 3 biomasses type résidu agricole (paille de blé, paille d'orge et bagasse de sucre d'Haïti) et 2 biomasses type résidu sylvicole (branchage de Noisetier et branchage d'Acacia) pour étudier l'effet du prétraitement fongique avec *Ceriporiopsis subvermispora* sur le potentiel biométhane. Pour caractériser les comportements de ce champignon lignocellulosique, les activités enzymatiques (MnP, laccase et cellulase) sont mesurées. Pour caractériser l'effet du prétraitement fongique, les changements de composition biochimique et de structure de 5 échantillons sont évalués avant et après le prétraitement fongique.

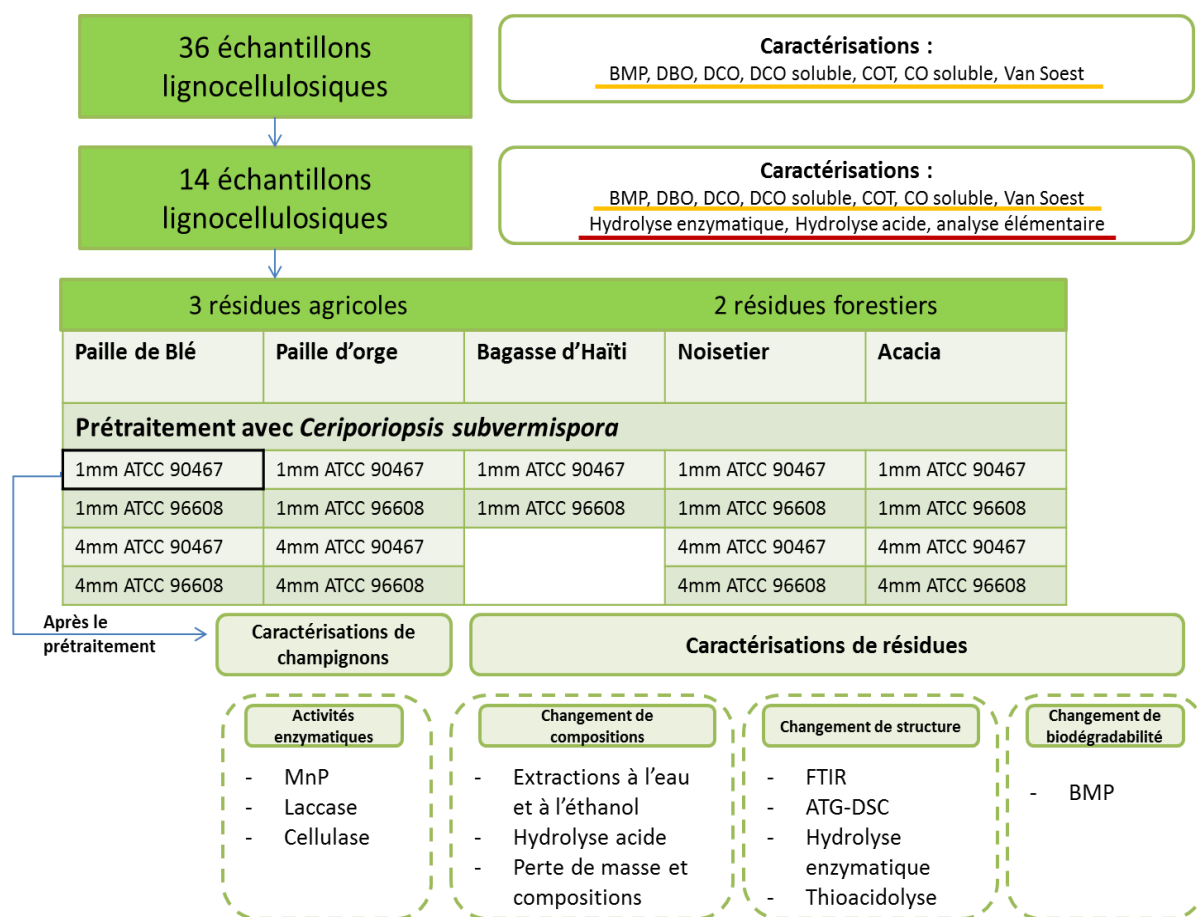


Figure 20 : Plan expérimental

B. Matériels et méthodes

I. Biomasses sélectionnées

La nature et l'origine des matrices sélectionnées pour l'étude expérimentale de comparaison des méthodes de caractérisation sont résumées dans le Tableau 13 suivant.

Tableau 13 : Origine des biomasses sélectionnées.

#	Designation	Nature	Origin and collection	Region and Country	Category
S1	Corn stover	<i>Zea mays</i>	Private farm <i>Residues collected on the soil 10 days after harvested</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S2	Corn bagasse	<i>Zea mays</i>	Private farm <i>Residues collected on the soil 10 days after harvested</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S3	Barley Straw	<i>Hordeum vulgare</i>	Private farm <i>Residues directly collected with harvest</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S4	Wheat Straw	<i>Triticum aestivum</i>	Private farm <i>Residues directly collected with harvest</i>	Franche-Comté, France	Agricultural residue
S5	Sugarcane bagasse #1	<i>Saccharum officinarum</i>	Artisanal Rhum distillery <i>No crushing, and sugar extraction with single roller</i>	Plaine de Cul-de-Sac, Port-au-Prince, Haiti	Agricultural residue
S6	Sugarcane bagasse #2	<i>Saccharum officinarum</i>	Industrial bioethanol refinery <i>Crushing, and sugar extraction with multi rollers</i>	Recife, Brasil	Agricultural residue
S7	Hazel branches	<i>Corylus avellana</i>	Private forest <i>Sample collected directly after cutting thin branches (diam. < 1cm)</i>	Régny - Rhône-Alpes, France	Forest residue
S8	Pseudo-acacia branches	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Private forest <i>Sample collected directly after cutting thin branches (diam. < 1 cm)</i>	Régny - Rhône-Alpes, France	Forest residue
S9	Mix Wood #1	Mix of branches	Greenwaste composting plant <i>Collected at the beginning of the composting process</i>	Décines-Charpieu, – Rhône-Alpes, France	Forest residue
S10	Mix Wood #2	Wood refuse	Green waste composting plant <i>Collected at the end of the composting process, by sieving</i>	Décines-Charpieu, – Rhône-Alpes, France	Forest residue
S11	Wood	<i>Pinus radiata</i>	Sawmill plant	Saint-Chamont, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S12	Mix Green waste #1	Mix on green waste	Composting plants <i>Sample collected at the beginning of the composting process</i>	Décines-Charpieu, – Rhône-Alpes, France	Forest residue
S13	Mix Green waste #2	Mix of leaves, yard trimmings and small pieces of branches	Campus of university <i>Sampled 3 days after green waste collected</i>	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S14	Mix Green waste #3	Mix of branches	Campus of university <i>Sampled 60 days after green waste collected</i>	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	Forest residue

S15	Newspaper	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S16	Office paper	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S17	Magazine paper	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S18	Cardboards	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S19	Cotton (Textile)	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S20	Sanitary Textile	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S21	Composites (Tetrabricks)	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S22	Food Waste	-	Waste collected from Res2	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S23	Fine fraction from RMSW	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S24	Mix papers from MSW	-	Waste collected from recycling plant	Rillieux-la-Pape, Rhône-Alpes, France	MSW residue
S25	Mix Cardboards from MSW	-	Waste collected from recycling plant	Rillieux-la-Pape, Rhône-Alpes, France	MSW residue
S26	RMSW #1	-	Waste collected from MBT plant	Ile de France, France	MSW residue
S27	RMSW #2	-	Waste collected from MBT plant	Barcelone, Spain	MSW residue
S28	RMSW #3	-	Waste collected from MBT plant	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	MSW residue
S29	Biowaste #1	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S30	Biowaste #2	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste

S31	Biowaste #3	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S32	Biowaste #4	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S33	Digestate from RMSW #1	-	Waste collected from AD plant	Ile de France,	MSW residue
S34	Digestate from RMSW #2	-	Waste collected from AD plant	Barcelone, Spain	MSW residue
S35	Digestate from Biowaste #1	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S36	Digestate from Biowaste #2	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste

II. Prétraitements fongiques

II.1. Préculture des champignons et conditions d'ensemencement

Les souches de pourriture blanche fongique *C. subvermispora*, ATCC 96608 et 90467 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA). Elles ont été isolées à partir d'échantillons de bois décomposé. L'ATCC recommande la souche 96608 est utilisée pour produire la laccase, alors que la souche 90467 est généralement utilisée pour l'étude de la dégradation de lignocellulose.

Les deux souches ont été livrées à 4°C dans un tube à essais bouché, maintenues sur un gel d'agar à 33,6 g/L d'extrait de malt (milieu MEA). Trois jours après réception des échantillons, Les souches ont été recultivées à 28°C sur milieu solide MEA en boîte de Pétri. Dix disques (chacun d'un diamètre de 10 mm) milieu colonisé ont alors été prélevés à 7 jours pour inoculer des cultures liquides. Celles-ci ont été réalisées en Erlenmeyer de 500 mL contenant 50 mL d'une solution d'extrait de malt à 20 g.L⁻¹. Après 7 jours incubation à 28°C dans des conditions statiques, la culture liquide est homogénéisée dans un agitateur pendant trois cycles de 15 secondes et ensuite utilisée pour l'inoculation des essais de prétraitement pour chacun des substrats dont on souhaite étudier la dégradation.

II.2. Conditions de prétraitement

Une masse de substrat correspondant à de l'ordre de 10 g de matière sèche est pesée avec précision puis introduite dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 30 mL d'eau permutée. Les Erlenmeyer bouchés de coton cardé sont alors autoclavés pendant 30 min à 121°C. Après refroidissement à température ambiante, les Erlenmeyer sont inoculés par 2 mL de culture liquide préparée préalablement (voir § III.1). Des témoins stériles sont préparés de la même manière en remplaçant l'inoculum par le même volume d'eau permutée stérile.

Les incubations sont réalisées pendant 28 jours en conditions statiques, c'est-à-dire sans agitation, dans un incubateur thermostaté à 28 °C. La Figure 21 illustre le protocole pour les essais ensemencés (notés F) et les blancs (témoins) stériles (notés T).

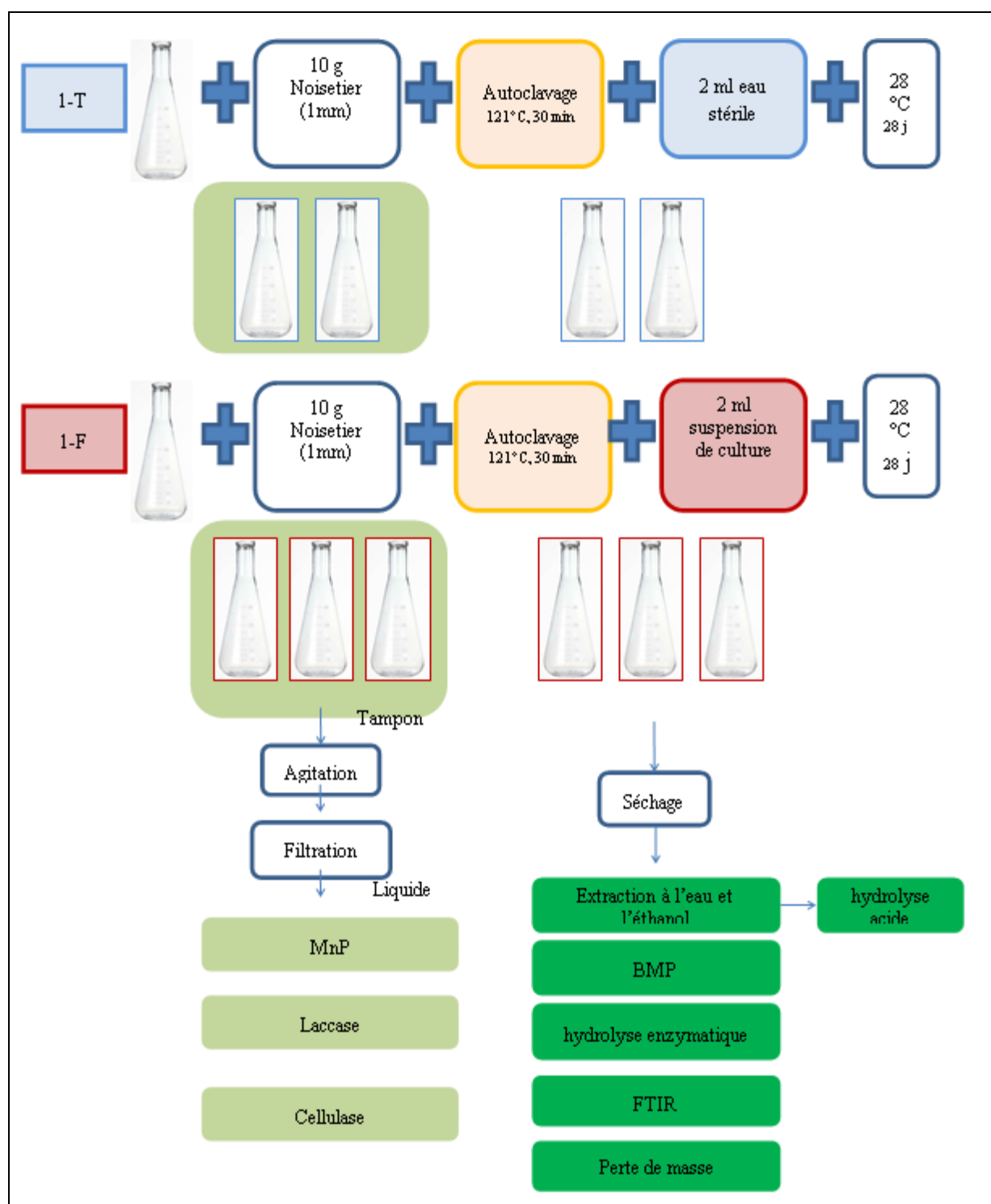


Figure 21 : Procédure de réalisation des essais d'incubations sur matrices « témoins » T (stérilisées) et matrices ensemencées (stérilisées et inoculées).

III. Caractérisation des substrats

III.1. Analyses globales de la matière organique

III.1.1. Teneur en matière sèche et matières volatiles

Les teneurs en matières sèches (MS) et volatiles (MV) sont déterminées respectivement selon les méthodes standardisées AFNOR NF EN 14346 (2007) et AFNOR NF U 44-160 (1985). La teneur en MS est déduite de la perte de masse d'un échantillon après passage en étuve à 105°C pendant 24 heures. Elle est déterminée en triplicats dans des creusets préalablement séchés sur des masses d'environ 1 g à 2 g d'échantillon. La teneur en MV est déterminée par mesure de la perte de masse de l'échantillon sec lors de sa calcination à 550°C dans un four à moufles pendant 4 heures. La masse de matière volatile est obtenue par différence entre la masse de matière sèche avant calcination et la masse de matière minérale résiduelle après calcination.

III.1.2. Mesure de la demande chimique en oxygène

La Demande Chimique en Oxygène DCO est déterminée par oxydation sulfochromique en présence de bichromate de potassium. Le protocole développé au LGCIE est réalisé sur échantillons solides cryobroyés. Il s'inspire de la norme internationale ISO EN NF 14235 (1998) intitulée « Qualité du sol – Dosage du carbone organique oxydation sulfochromique ». Le carbone organique est oxydé dans un mélange d'une solution de bichromate de potassium (en excès) et d'acide sulfurique à une température de 135°C. Les ions bichromates, qui colorent la solution en rouge-orangé, sont réduits en ions Cr^{3+} qui colorent la solution en vert. L'intensité du vert est mesurée par spectrophotométrie. La méthode est calibrée en utilisant du glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) comme source de carbone oxydable. Les résultats sont exprimés en $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{MS}}$.

III.1.3. Mesure du CT, CIT et COT et analyse élémentaire

Le carbone total (CT) d'un échantillon solide est composé du carbone inorganique total (CIT) et du carbone organique total (COT). Le dosage du carbone total (CT) des déchets solides selon la norme NF ISO 10694 (1995) est basé sur la libération sous forme de CO_2 du carbone minéral et l'oxydation en CO_2 du carbone organique par l'oxygène à 950°C en présence d'un catalyseur (Zirconium). Le dioxyde de carbone produit est quantifié par infrarouge. La mesure du COT s'effectue de la même manière mais après attaque à l'acide ortho phosphorique (H_3PO_4 15%) des échantillons dans le but d'éliminer préalablement le carbone inorganique. Le CIT est calculé par différence du CT et du COT. Les analyses sont effectuées en triplicats avec un COT-mètre OI Analytical.

Les analyses élémentaires ont été réalisées au service central d'analyses du CNRS. Les analyses telles que les teneurs en hydrogène (H), en azote total (N), et en soufre (S) nécessitent environ 100 mg d'échantillons solides cryobroyés. La méthode mise en œuvre est la même que celle préconisée dans l'analyse élémentaire des sols (référence). Ces analyses sont basées sur une oxydation totale à haute température (900°C pour le carbone et l'azote) de la matière d'un échantillon en présence d'un catalyseur, et la quantification des oxydes gazeux créés.

III.1.4. Comportement à la lixiviation

L'étude du comportement à la lixiviation est réalisée en triplicats sur chacun des substrats selon la norme EN 12457-2 (2002) « Essai de conformité pour lixiviation des déchets fragmentés et des boues ». Le ratio liquide/solide (L/S) est de 10 en tenant compte de l'humidité initiale de l'échantillon solide. Les suspensions des substrats dans de l'eau permutée sont agitées par retournement mécanique ($10 \text{ rotations} \cdot \text{min}^{-1}$). Après 3h d'agitation à température ambiante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), les échantillons sont centrifugés (9000 rpm pendant 30 minutes) puis filtrés sous vide successivement sur filtre en fibre de verre ($1,2 \mu\text{m}$) et sur filtre en acétate de cellulose ($0,45 \mu\text{m}$).

Le pH, la conductivité, la Demande Chimique en Oxygène (DCO) et le Carbone Organique Dissous (COD) ou COT soluble sont mesurés sur les lixiviats.

La demande chimique en oxygène (DCO) sur liquide est mesurée selon la norme AFNOR NFT 90-101 (2001). Elle exprime la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique (biodégradable ou non) d'un échantillon à l'aide d'un oxydant, le bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Les mesures sont réalisées par dosage photométrique à 620 nm du Cr(III) formé à l'aide d'un photomètre HACH. La gamme de mesures impose généralement une dilution préalable au dixième des solutions à doser..

Le COD est mesuré selon la méthode AFNOR NF EN 1484 (1997) T 90-102 à l'aide d'un appareil TOCL Shimadzu. La mesure du carbone total dissous (somme du carbone sous forme organique et inorganique) est obtenue par oxydation catalytique d'un microvolume d'échantillon injecté dans un four à 680°C rempli d'un catalyseur de Pt sous flux d'oxygène. Le produit de la réaction, CO_2 , est mesuré par une cellule infrarouge non dispersive. Le carbone inorganique (TIC) est ensuite mesuré via le CO_2 produit lors de la réaction entre le TIC de l'échantillon et l'acide orthophosphorique à 15%. Le carbone organique est ainsi déduit de la mesure du carbone total et du carbone inorganique.

III.2. Caractérisation biochimique de la matière organique

L'analyse biochimique d'échantillons de biomasse consiste à déterminer la nature et la teneur des constituants de la matière organique. Les techniques sont généralement basées sur le principe de fractionnement en familles de composés organiques qui (fraction soluble, lipides, protéines, cellulose, hémicellulose, substances humiques, etc.). Les familles de constituants sont expérimentalement estimées par leurs solubilités communes ou leurs sensibilités à l'hydrolyse dans les solvants ou réactifs utilisés. Le fractionnement est réalisé soit par une extraction simple, soit par des extractions successives utilisant des solvants organiques ou aqueux. Les méthodes les plus citées dans la littérature sont le fractionnement van Soest (van Soest & Wine, 1967) et le fractionnement selon la norme ASTM E1758-01 (2007) sur laquelle se base la procédure NREL intitulée « Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass » (NREL, 2011). Ces deux méthodes ont été retenues pour la caractérisation biochimique de nos échantillons.

III.2.1. Analyse des fibres, procédure van Soest

a. Principe

La procédure suivie est décrite par la norme AFNOR XP U44-162 (2005) basée sur le protocole développé par van Soest et Wine (1967). Elle consiste en une extraction séquentielle de la matière organique, selon la solubilité des composés constitutifs (la méthode a été développée pour les constituants pariétaux de la biomasse végétale). Les hémicelluloses sont solubles (hydrolysables) dans les solutions d'acides faibles et forts, la cellulose est hydrolysée en milieu acide fort et la fraction résiduelle, apparentée à la lignine dans le cas de biomasses végétales, n'est pas significativement soluble ni hydrolysable même dans une solution concentrée d'acide fort. Les masses sèches de chaque résidu d'extraction sont exprimées en pourcentage de la matière volatile initialement introduite (%MV).

b. Mode opératoire et exploitation des résultats

L'extraction séquentielle se déroule en plusieurs étapes, illustrées par la Figure 22.

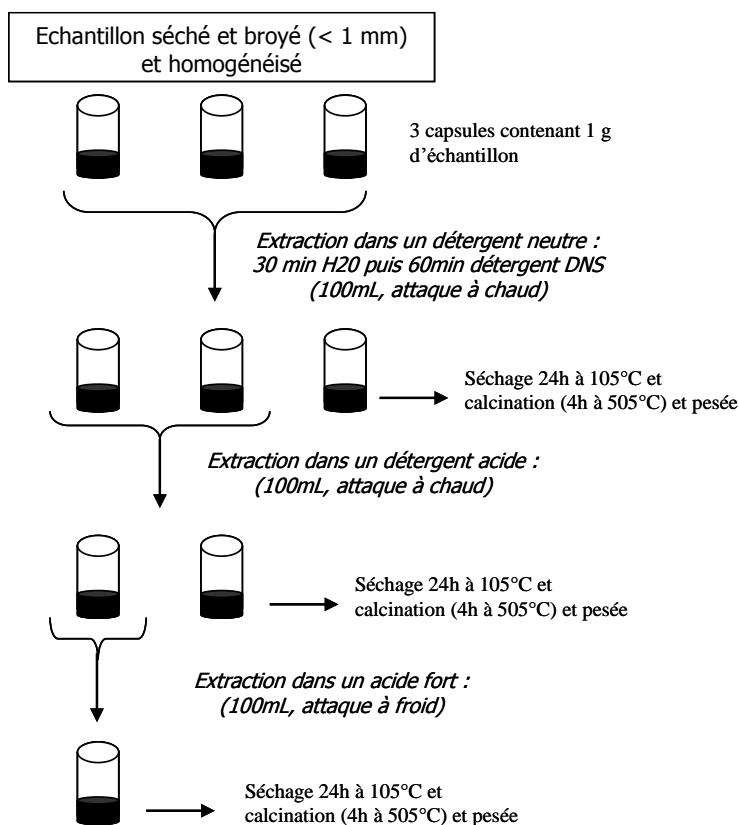


Figure 22 : Fractionnement biochimique en SOL, HEM, CELL et RES d'après la procédure modifiée de van Soest décrite dans la norme XP U44-162 (2005).

- Les composés organiques insolubles dans le détergent neutre sont désignés par NDF (Neutral Detergent Fiber). Dans un substrat d'origine végétale, cette fraction correspond biochimiquement à la cellulose, aux hémicelluloses et à la lignine. Les autres composés sont solubles dans le détergent neutre. Ils sont désignés par SOL.
- Les composés organiques insolubles dans le détergent acide ADF (Acid Detergent Fiber) regroupent dans une biomasse végétale la cellulose et la lignine car les hémicelluloses sont

hydrolysées et ainsi solubilisées dans le détergent acide. La différence de masse entre les 2 résidus (NDF - ADF) permet d'estimer la teneur en hémicelluloses désignées par HEM.

- Le résidu organique obtenu par action de l'acide sulfurique à 72% sur le résidu ADF correspond à la lignine ADL (Acid Detergent Lignin). La différence de masse (ADF - ADL) permet d'estimer la teneur en cellulose désignée par CEL car celle-ci est hydrolysée et ainsi solubilisée dans le dans l'acide sulfurique concentré. Dans une biomasse végétale, la fraction ADL représente alors la lignine contenue dans l'échantillon, mais elle peut aussi contenir d'autres substances comme des composés azotés.

Après chaque étape d'extraction, la matière organique résiduelle est quantifiée par calcination à 550°C, pendant 4h (MV_{NDF} , MV_{ADF} , et MV_{ADL}). Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage massique de matière volatile initiale :

$$SOL = 100 - MV_{NDF} \quad \text{Équation 1}$$

$$HEM = MV_{NDF} - MV_{ADF} \quad \text{Équation 2}$$

$$CELL = MV_{ADF} - MV_{ADL} \quad \text{Équation 3}$$

$$RES = MV_{ADL} \quad \text{Équation 4}$$

III.2.2. Protocole NREL

a. Principe

Le centre américain de recherche sur les énergies renouvelables (National Renewable Energy Laboratory, NREL – voir liste des références NREL et site web) propose une technique d'extraction bien détaillée, permettant la quantification des polysaccharides structuraux et de la lignine. La méthode proposée est très proche de la procédure standard ASTM E1758-01 (2003) pour la détermination des composés hydrocarbonés par CLHP.

b. Mode opératoire et exploitation des résultats

Etape 1 : Détermination de matières extractibles. Cette procédure utilise un processus d'extraction en deux étapes pour éliminer la matière soluble dans l'eau et dans l'éthanol qui pourraient induire des interférences dans les analyses qui suivent. Les matières solubles dans l'eau peuvent être entre autres des matières inorganiques, des sucres non-structuraux et des matières azotées. La matière inorganique soluble dans l'eau peut provenir de la biomasse ou de n'importe quelle matière soluble associée comme le sol ou l'engrais. La matière soluble dans l'éthanol comprend la chlorophylle, les cires d'autres composants mineurs.

Deux extractions successives à l'eau et à l'éthanol sont réalisées avec un système d'Extraction Accélérée par Solvant, ASE 350 DIONEX™. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Peser environ 4 g d'échantillon solide et sec dans une cellule jusqu'à ce que la cellule soit remplie, noter la masse exacte.

-Conditions d'extraction à l'eau:

Température : 100°C heat : 5 min

Static Time : 7 min Cycles : 3

Rinse volume : 150 % Purge : 120 s

Solvant A : 0 solvent type

Solvant B : 1 eau

Solvant C : 0 Solvent type

Cell type : SST

Solvent saver : OFF

-Conditions d'extraction à l'éthanol (flacon de solvant n°3), méthode 5 :

Température : 100°C heat : 5 min

Static Time : 7 min Cycles : 3

Rinse volume : 150 % Purge : 120 s

Solvant A : 0 solvent type

Solvant B : 0 solvent type

Solvant C : 1 éthanol

Cell type : SST

Solvent saver : OFF

Après extraction, les deux phases liquides obtenues (eau et éthanol) sont récupérées dans des coupelles en aluminium tarées et placées dans une étuve à 105°C jusqu'à évaporation totale des solvants. Les coupelles sont ensuite pesées. Les résidus solides sont placés dans une étuve à 38°C pendant 48h, pesés puis stockés dans une chambre froide jusqu'à l'hydrolyse acide.

On peut donc finalement déterminer la fraction soluble dans chaque solvant grâce à la formule suivante :

$$\text{Extrait } (\%_{MS}) = 100 - \left(1 - \frac{m_{\text{ext}}}{m_{\text{sch}}}\right) \times 100$$

Équation 5

Etape 2 : Hydrolyse chimique et analyse des sucres. Les résidus secs obtenus après les extractions à l'eau puis à l'éthanol suivies d'un séchage (300 mg) sont attaqués par une solution d'acide sulfurique à 72% (3 mL) dans un bain-marie à 30°C pendant 1 heure. On ajoute alors 84 ml d'eau pure et on porte à 121°C pendant 1 heure dans un autoclave. Une filtration sous vide (Büchner) permet de récupérer deux phases. D'une part, la phase liquide très acide (pH = 1) qui est neutralisée par ajout de carbonate de calcium anhydre puis filtrée à l'aide de seringue et d'un filtre de diamètre 0,22 µm. La solution ainsi obtenue est ensuite analysée.

Analyses des sucres dans les hydrolysats. Cette quantification est réalisée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec un appareil Waters LC module 1 équipé d'un détecteur par indice de réfraction Waters classiquement utilisé pour le dosage des monomères osidiques issus de l'hydrolyse. Cette méthode permet de doser les sucres suivants : glucose, xylose, cellobiose, galactose, arabinose et mannose. Finalement, le teneur en glucose permet de déterminer la fraction de cellulose (%_{MS}) et les teneurs des autres sucres sont assimilées à la fraction d'hémicellulose (%_{MS}). Les conditions opératoires de l'analyse des sucres est présentée dans l'annexe 1.

Etape 4 : Quantification de la lignine soluble. La lignine soluble en milieu acide est quantifiée par spectrophotométrie à 205 nm sur analyseur SHIMADZU UV-2450. La méthode est détaillée dans l'annexe 2.

Etape 5 : Quantification de la lignine insoluble. La phase solide est séchée dans une étuve à 105°C pendant une nuit puis calcinée à 575°C pendant 24h. La masse perdue après calcination (Masse Volatile) est identifiée comme étant la fraction de lignine (%_{MS}) (*cf.* annexe 2)

III.2.3. Caractérisation de la lignine par thioacidolyse

L'analyse de la structure de la lignine par thioacidolyse est une méthode qui vise à dépolymériser les lignines par rupture des liaisons beta-O-4. A partir des unités H, G ou S engagées seulement en liaisons β -O-4, elle fournit des monomères thioéthylés H, G ou S de manière très spécifique et avec un rendement élevé. La thioacidolyse informe donc sur un paramètre structural majeur des lignines natives, la fréquence des unités liées seulement en β -O-4, talon d'Achille de ces polymères. L'analyse par thioacidolyse a été réalisée à l'Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 AgroParisTech/INRA, selon la procédure décrite par Lapierre et coll. (1995). Les monomères sont extraits du milieu réactionnel et triméthylsilylés avant injection et dosage en CPG-SM.

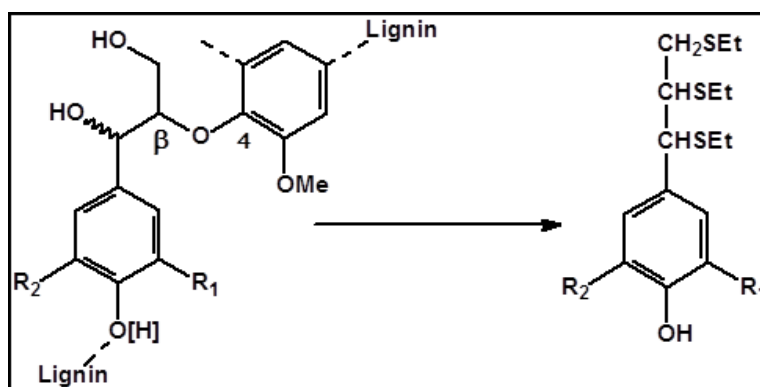


Figure 23 : Principe de l'évaluation des unités de lignines liées seulement par des liaisons β -O-4 par thioacidolyse. Les unités p-hydroxyphényles H ($R_1=R_2=H$), guaiacyles G ($R_1=OMe$; $R_2=H$) et syringyles S ($R_1=R_2=OMe$) engagées seulement dans des liaisons β -O-4 donnent spécifiquement des monomères thioéthylés H, G et S lors de la thioacidolyse.

III.3. Caractérisations spectrales et thermogravimétrique de la matière organique

III.3.1. Analyse IRTF

a. Principe

L'analyse infrarouge à transformée de Fournier utilise un interféromètre (au lieu d'un monochromateur en spectroscopie infrarouge conventionnelle (dispersive)) qui enregistre la quantité d'énergie absorbée lorsque la fréquence de lumière infrarouge varie. Le signal obtenu est un interférogramme qui est transformé mathématiquement selon Fourier de façon à obtenir un spectre identique à celui obtenu par une spectroscopie infrarouge conventionnelle. Cette technique à Transformée de Fourier est moins onéreuse et plus rapide. Les bandes caractéristiques des matériaux lignocellulosiques, décrites dans les tables IR et la littérature (Guo (2008), Gurgel (2012) et Hsu (2010)), sont listées dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** de l'annexe 3.

b. Appareillage et mode opératoire

L'analyse IRTF a été réalisée avec un spectromètre Spectrum One de Perkin Elmer. Les échantillons sont cryobroyés avant analyse. Dans un mortier, on introduit 1,5 +/- 0,1 mg d'échantillon et du KBr (préalablement séché à 100°C) jusqu'à obtenir 100 mg \pm 1 mg de mélange, et on prépare une poudre uniforme. On prélève alors 40 mg de ce mélange qu'on introduit dans un bâti placé sous presse à une pression de 10 tonnes par cm. La pastille obtenue est ensuite placée dans le spectromètre. Une dizaine de spectres sont enregistrés avec une résolution de 4 cm⁻¹.

c. Exploitation des données

La FTIR appliqué aux substrats végétaux permet d'étudier les changements structuraux : disparition de bandes caractéristiques des hémicelluloses à 1245 et 1740 cm⁻¹, diminution des bandes caractérisant la lignine (1460 et 1425 cm⁻¹).

Des méthodes ont été proposées pour calculer un indice de cristallinité à partir de la taille ou de l'aire relative de bandes d'absorption (Akerholm, 2004 ; Kataoka, 1998).

III.3.2. Analyse calorimétrique différentielle et thermogravimétrique couplées

a. Principe

L'analyse calorimétrique différentielle en programmation linéaire de température (ACD), souvent plus connue sous son sigle anglais DSC (pour Differential Scanning Calorimetry) permet d'étudier un large spectre de phénomènes (Claudy, 2005 ; Eyraud & Accary, 1992 ; Elégant & Rouquerol, 1996). En effet, la plupart des transformations physiques ou chimiques qui peuvent se produire dans un matériau s'accompagnent d'un échange de chaleur. La mesure précise, par analyse thermogravimétrie (ATG), de l'évolution de la masse de l'échantillon dans les mêmes conditions de température et d'atmosphère, permet souvent d'orienter l'identification des accidents thermiques. En effet, les changements de phase (fusion, transition de phase...) se produisent généralement à masse constante (sauf l'ébullition)

tandis qu'une oxydation implique un gain de masse et une décomposition ou une déshydratation, une perte de matière solide.

Ces deux techniques peuvent être couplées afin de mesurer les paramètres dans des conditions strictement identiques ce qui permet des recoupements d'informations plus rigoureux. La rapidité et la simplicité de mise en œuvre de l'analyse thermique sont des arguments forts pour tenter de l'appliquer à la caractérisation de la matière organique dans différents déchets. Néanmoins, cette approche est encore peu développée en raison de la complexité de ces matériaux. Les travaux publiés concernent les composts d'ordures ménagères et déchets verts (Dell'Abate *et al.*, 1998, 2000 ; Smidt & Lechner, 2005 ; Provenzano *et al.*, 2006), les substances humiques issues de leur fractionnement (Melis & Castaldi, 2004) ou extraites de milieu naturels (Esteves & Duarte, 1999), les boues de station d'épuration (Otero *et al.*, 2002a ; 2002b). Les méthodes thermiques sont employées pour caractériser en quantité et en qualité la matière organique contenue dans ces matrices complexes et pour évaluer des procédés de stabilisation de déchets.

b. Appareillage et mode opératoire

L'appareil utilisé pour la caractérisation thermique des échantillons ligno-cellulosiques est un Labsys TG/DSC 1600 de SETARAM qui permet une mesure simultanée de l'évolution de la masse de l'échantillon et des quantités de chaleur qu'il échange lorsqu'il subit un programme de température. Il possède une structure constitué du contrôleur et associant le module de balance à fléau avec les capteurs d'ACD à flux dans un four résistor métallique. Une circulation d'eau est en permanence dans le four ce qui permet alors une régulation de la température. L'appareil fonctionne sous un flux de gaz dirigé de bas en haut par deux coquilles qui entourent la canne de mesure.

Toutes les analyses ont été faites avec une canne TG-ACD ambiante/1600°C. Son plateau en céramique possède, sous le support destiné à recevoir le creuset de référence et le creuset contenant l'échantillon, deux thermocouples montés en opposition afin de capter le signal calorimétrique. De plus, toutes les manipulations ont été faites dans un creuset en alumine de forme haute et d'une capacité de 100µl. Le logiciel « SETSYS » permet de piloter les différents paramètres et permet l'exploitation des courbes TG-ACD.

Le choix des conditions expérimentales est primordial. En effet, les facteurs tels que la vitesse de chauffe, la nature du gaz de balayage, le type de creuset utilisé, la masse et même la granulométrie de l'échantillon interviennent sur le résultat de l'expérience.

Le choix de la vitesse de chauffe est un compromis qui inclut la prise en compte de la durée des expériences. Une faible vitesse permet une meilleure résolution de deux phénomènes très voisins mais peut nuire à la sensibilité car les pics associés ont moins d'amplitude. D'autre part, l'augmentation de la vitesse de chauffe entraîne un glissement des maxima des pics vers des températures plus élevées. Après nos essais préliminaires, notre choix s'est porté sur les conditions décrites dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Conditions opératoires utilisées pour l'analyse thermogravimétrique des échantillons.

Canne	Creuset	Gaz de balayage	Vitesse de chauffe	Domaine de températures	Masse de l'échantillon
ACD 1600°C	Al ₂ O ₃	Air	10°C/min	20°C-850°C	10,4 ± 0,1 mg

Les essais ont été effectués en atmosphère oxydante obtenue par balayage d'air à un débit de 1,8 l.h⁻¹. La masse des prises d'essais est de l'ordre de 10 mg.

Les échantillons ont été soumis au programme de température suivant :

- Phase 1 : Isotherme à 20°C pendant 300sec
- Phase 2 : Montée de 20°C à 850°C à une vitesse de 10°C/min
- Phase 3 : Descente de 850°C à 20°C à une vitesse de 10°C/min

La durée d'une analyse est d'environ 3h.

c. Exploitation des résultats

La méthode d'exploitation des résultats est détaillée dans l'annexe 4.

IV. Evaluation de la biodégradabilité de biomasses lignocellulosiques

IV.1. Accessibilité enzymatique de la cellulose

IV.1.1. Principe

Ce test consiste à estimer la biodisponibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique dans les différents substrats, avant et après incubation. La procédure mise en œuvre est celle développée par le NREL (NREL, 2008 - Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass). Elle consiste à suivre la production de glucose par incubation du substrat à 50°C sur une semaine en présence d'un mélange enzymatique constitué de cellulases et de β -glucosidase. Mode opératoire et exploitation des résultats.

IV.1.2. Mode opératoire et exploitation des résultats

Les deux enzymes sont cellulases (Sigma-Aldrich, ref. C2730) et de β -glucosidase (Sigma-Aldrich, ref. C6105). Les activités enzymatiques ont été mesurées avant les essais d'hydrolyse enzymatique. Dans cette étude, les charges d'activités de cellulase et β -glucosidase sont de 60 FPU. g⁻¹ et 64 ρ NPGU. g⁻¹ de cellulose. Les incubations sont réalisées sur des suspensions aqueuses des substrats (0.15 g) à 15 g.l⁻¹ dans une solution tampon de citrate de sodium à 12,9 g.l⁻¹ (pH 4,8). Après ajout d'enzyme, les suspensions sont placées en incubation dans un bain-marie sous agitation à 150 rpm. Au bout de 168 h, la réaction est stoppée en portant les suspensions à l'ébullition pendant 5 min pour désactiver les enzymes. Le surnageant est filtré à 0,22 μ m et le glucose en solution est dosé par CLHP sur un appareil Waters® équipé d'un détecteur RID et d'une colonne séparative Bio-Rad HPX-87H. La phase mobile constituée d'une phase aqueuse à 0.49 g.l⁻¹ H₂SO₄ circule à un débit constant de 0,6 ml.min⁻¹.

L'accessibilité enzymatique de la cellulose a été déterminée comme suit :

$$\% \text{Digestibilité enzymatique de cellulose} = \frac{\text{cellulose digéré (g)}}{\text{cellulose ajouté (g)}} \times 100 \quad \text{Équation 6.}$$

IV.2. Demande biologique en oxygène sur solide

IV.2.1. Principe

La demande biochimique en oxygène mesurée sur substrats solides (DBOs) est une méthode équivalente à la DBO « classique » mais réalisée sur matériaux granulaires en suspension aqueuse. La procédure développée dans notre laboratoire s'inspire de celle décrite dans la procédure internationale ISO NF 10707 (1994) développée pour la détermination de la biodégradabilité aérobie ultime de composés organique dans l'eau par analyse de la demande biochimique en oxygène.

IV.2.2. Mode opératoire

La DBOS est déterminée dans des flacons OxiTop™ sur substrats broyés à < 1 mm en suspension dans un milieu nutritif minéral. La suspension est inoculée avec une boue de station d'épuration et mis en incubation sous agitation magnétique à 30°C dans l'obscurité pendant 28 jours (mesure de la DBOS₂₈). On introduit 100 mg_{MV} d'échantillon à tester dans chaque flacon contenant 100 ml d'eau permutée, puis on ajoute 10 ml de solution minérale (voir composition ci-après) et 10 ml d'inoculum (%_{MV} de l'inoculum de l'ordre de 15 g.l⁻¹). Les flacons sont clos hermétiquement à l'aide d'une « tête » OxiTop™. La dégradation biologique du substrat carboné conduit à la consommation de l'oxygène présent dans le flacon ainsi qu'à la production de dioxyde de carbone. Ce dernier est piégé grâce à des pastilles de soude placées dans une nacelle suspendue au-dessus du « milieu réactionnel ». Ainsi, la consommation d'oxygène se traduit par une dépression au sein du flacon, dépression mesurée automatiquement par la tête OxiTop™. La dépression mesurée est proportionnelle au volume d'oxygène consommé qui peut donc être déterminé. Les témoins positifs dans lesquels on ajoute en outre du glucose et les témoins négatifs dans lesquels aucun substrat n'est apporté sont préparés pour chaque série d'incubation afin de pouvoir soustraire la consommation d'oxygène due à l'inoculum seul. Tous les essais ainsi que les témoins sont réalisés en triplicats.

IV.2.3. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mg d'oxygène consommé par gramme de matière sèche ou matière volatile de substrat (mgO₂.g⁻¹_{MS} ou MV). La biodégradabilité du substrat est déterminée sur la base de sa DCO totale (cf. équation 9).

$$BD_{Aéro} = \frac{DBO_{28}(mgO_2.g_{MS}^{-1})}{DCO_{Tot}(mgO_2.g_{MS}^{-1})} \times 100 \quad \text{Équation 7}$$

IV.3. Potentiel de production de biogaz

IV.3.1. Principe

Le test de production de biogaz permet de déterminer la quantité de biogaz (PB) et de méthane (PBM ou BMP, Biochemical Methane Potential en anglais) que l'on peut obtenir à partir d'un échantillon solide. Les conditions opératoires de l'essai doivent être optimales pour garantir la production maximale de méthane dans un temps suffisamment court, de l'ordre de quelques semaines. La méthode manométrique est la méthode retenue pour la détermination du PBM sur nos échantillons de biomasses lignocellulosiques, initiales ou après prétraitement. Les essais sont réalisés dans des flacons de 1 litre hermétiquement fermés afin de garantir une parfaite étanchéité aux gaz. La production de biogaz est suivie par un relevé de la pression et de la composition du biogaz (CH₄, CO₂, N₂, O₂ et H₂S) est analysée.

IV.3.2. Mode opératoire

Inoculum : l'inoculum anaérobie est préparé à partir d'une boue mésophile de digesteur anaérobie de station d'épuration entretenue dans un réacteur Biolafitte 20 l, avec jeune d'une dizaine de jours avant utilisation. La quantité d'inoculum introduite dans les flacons tests est de l'ordre de 4 à 6 g_{MV}.L⁻¹ (voir ci-dessous).

Echantillon à tester : La quantité de substrat ajouté dans les flacons correspond à une concentration finale de 2 à 3 g_{MV}.l⁻¹ de milieu réactionnel, correspondant à un rapport MVsubstrat / MV inoculum de l'ordre de 0,5;

Température : Les incubations sont réalisées en chambre thermostatée, en conditions mésophiles (35°C).

Remplissage des flacons : Les essais sont réalisés dans des flacons en verre de 1000 mL. Le volume d'inoculum à rajouter dépend de sa teneur en MV qui est déterminée avant de démarrer chaque série d'essais. A titre d'exemple pour une masse de 2 g MV de substrat, nous ajoutons 200 ml d'inoculum à 20 g_{MV}.l⁻¹, soit 4 g_{MV} dans 400 ml de milieu minéral. Le volume du substrat ajouté est négligeable (quelques mL). Le volume du ciel gazeux est déterminé au début de l'essai pour chaque flacon par différence de masse (pesée avant et après remplissage complet du flacon avec de l'eau).

Milieu minéral : La solution minérale (ou Milieu Nutritif Minéral MNM) est préparée selon les préconisations de la norme ISO 11734, 1995 relatives à la mesure de la biodégradabilité ultime de composés organiques dans les boues de digesteur. Sa composition est la suivante : un tampon phosphate (0,27 g de KH₂PO₄, 1,12 g de Na₂HPO₄.12H₂O) ainsi que des sels minéraux (0,53 g de NH₄Cl, 0,075 g de CaCl₂.2H₂O, 0,10 g de MgCl₂.6H₂O) dissous dans 1000 ml d'eau distillée. 3 ml d'une solution d'éléments traces contenant 5 mg.l⁻¹ de H₃BO₃, 5 mg.l⁻¹ de ZnCl₂, 3 mg.l⁻¹ de CuCl₂ et 100 mg.l⁻¹ de CoCl₂. 6H₂O sont ensuite ajoutés par litre.

Lancement des essais : Après ajout du substrat, du milieu nutritif et de l'inoculum, la suspension est purgée sous hotte pendant 10 minutes par un courant d'azote pour chasser l'oxygène dissous de la phase liquide et l'air du ciel gazeux. Les flacons sont alors hermétiquement fermés d'un septum en caoutchouc et d'un bouchon plastique adaptés garantissant une parfaite étanchéité. Ensuite, ils sont laissés au repos pendant 1h dans la chambre thermostatée à 35°C, puis dépressurisés (mesure de la pression initiale).

Suivi des essais : La production de biogaz est suivie généralement sur une soixantaine de jours, par mesure de pression à l'aide du manomètre électronique Digitron® d'une précision de l'ordre de 2 mbar et une pression maximale de 2000 mbar. La mesure de pression est effectuée avant et après évacuation du biogaz formé, de préférence, dégazé jusqu'à la pression minimale d'environ 1100 mbar. Avant chaque analyse de gaz, la pression à l'intérieur des flacons est mesurée. Il est nécessaire d'avoir une pression suffisante à l'intérieur du flacon pour pouvoir prélever l'échantillon de gaz sans mettre le système en dépression mais également pas trop élevée afin de rester dans le domaine de pression tolérable par l'appareil. Les mesures seront réalisées à des pressions de 1000 à 1200 mbar (limite supérieur de l'appareil = 1,2 fois la pression atmosphérique).

La composition du biogaz est déterminée par micro chromatographie en phase gazeuse par prélèvement direct au sein de la bouteille à l'aide des mêmes aiguilles que pour les mesures de pression. Le micro chromatographe Agilent à phase gaz (Hélium) est équipé de deux colonnes munies de détecteurs à conductivité thermique : une colonne « Poraplot U » pour la séparation du CO₂ et de l'H₂S et une colonne moléculaire « Molsieve » pour O₂, N₂ et CH₄.

IV.3.3. Expression des résultats

Volume de biogaz : Le volume de biogaz produit est déduit des mesures de pression selon la loi des gaz parfait. Les tests sont réalisés à volume et température constants. Le nombre de moles de gaz

$$\text{produites est donc : } n_2 - n_1 = \Delta n = (P_2 - P_1) \frac{V_g}{RT} = \frac{\Delta P \cdot V_g}{RT} \quad \text{Équation 8}$$

Avec V_g : volume du ciel gazeux)

Or le volume d'une mole de gaz à la pression P et à température T est de : $V_{molaire} = \frac{RT}{P}$ m3 avec T en K et P en Pa et R en J.mol⁻¹.K⁻¹. D'où un volume de biogaz produit de :

$$V_{Biogaz} = V_{molaire} \cdot \Delta n = V_{molaire} \cdot \frac{\Delta P \cdot V_g}{RT} = \frac{\Delta P \cdot V_g}{P} \quad \text{Équation 9}$$

Ce volume correspond à la quantité de biogaz produit dans les conditions expérimentales de pression atmosphérique p et $T = 308$ K (35°C). Il doit être corrigé afin de l'exprimer dans CNTP (273°K et 1013 mbar) :

$$V_{CNTP} = V_{308K} \times \frac{273}{308} \times \frac{P}{1013} \quad \text{Équation 10}$$

Volume de méthane : A partir des analyses réalisées sur le biogaz, nous connaissons au temps t_1 la teneur en méthane y_1 du ciel gazeux, de même au temps t_2 (y_2). Par un calcul analogue, nous obtenons le nombre de moles de méthane produit entre ces deux mesures :

$$V_{CH_4, CNTP} = \frac{y_2 P_2 - y_1 P_1}{p} V_g \frac{273}{308} \quad \text{Équation 11}$$

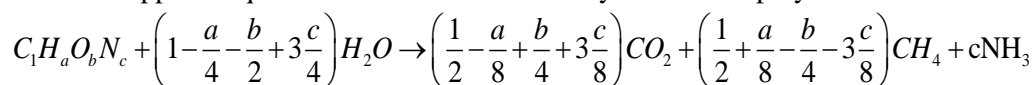
Biodégradabilité : la biodégradabilité est exprimée ici par le taux de conversion du substrat en méthane. Elle est estimée à partir des productions de méthane obtenues lors des tests par rapport à la production maximale théorique déterminée soit sur la base de la DCO_{Tot} de l'échantillon solide (cf. Équation 14), soit sur la base de la teneur en cellulose + hémicelluloses (%_{MV}) dans l'échantillon (cf. Équation 15).

$$BD_{Anaé} = \frac{PBM_{60} (NmL_{CH_4} \cdot g_{MV}^{-1})}{0,35 \times DCO_{Tot} (mgO_2 \cdot g_{MV}^{-1})} \times 100 \quad \text{Équation 12}$$

$$BD_{Anaé} = \frac{PBM_{60} (NmL_{CH_4} \cdot g_{MV}^{-1})}{\%_{Cell+Hem} \times PBM_{théorique} (NmL_{CH_4} \cdot g_{MV}^{-1})} \quad \text{Équation 13}$$

Avec $PBM_{théorique}$ de la cellulose et hémicelluloses estimé à 0,397 NL.g⁻¹_{MV} par de l'équation de

Buswell en supposant que la formule élémentaire moyenne de ces polymères est C₁H₂O₁. Équation 14



V. Mesures d'activités enzymatiques

V.1. Conditions d'extraction

L'activité de l'inoculum fongique utilisé pour prétraiter les substrats sélectionnés est appréciée en mesurant sa production d'enzymes hydrolitiques. L'extraction enzymatique nous permet de récupérer les enzymes sécrétées par le fonge après 28 jours de prétraitement de la biomasse.

En fin de période d'incubation, le substrat est collecté puis mis en suspension dans 120 ml de tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 4,5) pendant 4 h. dans un agitateur rotatif à 28°C pour solubiliser les enzymes produits. Cette suspension est ensuite filtrée pour récupérer les enzymes fongiques extracellulaires ainsi solubilisés. L'extrait enzymatique est conservé à -22 °C avant la réalisation des dosages enzymatiques (mesures d'activités enzymatiques).

V.2. Mesure de l'activité Manganèse Peroxydase

L'activité de MnP est déterminée par oxydation du phénol rouge ($\varepsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) selon la procédure développée par Ferraz 2007. Les mélanges réactionnels sont constitués de 3 ml de lactate de sodium 25 mM (pH 4,5), 3 ml de tampon succinate de sodium 20 mM (pH 4,5), 0,5 ml de H_2O_2 0,1 mM, 1 ml de MnSO_4 0,1 mM, 0,5 ml de sérum-albumine bovine 1% (poids/volume), 1 ml de phénol rouge 0,1% (poids/volume) et 1 ml d'extrait enzymatique. La réaction démarre par l'addition de H_2O_2 . À chaque intervalle de 1 min, 1 ml de mélange réactionnel est rapidement prélevé et la réaction stoppée par ajout dans l'échantillon prélevé de 30 μl de solution de NaOH 100 g/. L'absorbance est alors lue à 610 nm. L'activité enzymatique est exprimée en UI ml^{-1} , avec 1 UI définie comme 1 μmol de substrat oxydé par minute. Les unités totales par culture d'Erlenmeyer sont calculées en multipliant le nombre d'UI ml^{-1} par le volume total d'extrait enzymatique. Les résultats d'activité enzymatique sont finalement exprimés en UI g^{-1} d'échantillon ajouté dans l'Erlenmeyer.

$$\text{UI ml}^{-1} = \text{UI l}^{-1} \times 10^{-3} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{enz}}} \times \frac{10^6}{\varepsilon \times l} \times 10^{-3} \quad \text{Équation 15}$$

avec

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} = \text{pente de relation linéaire entre absorbance et le temps}$$

$$V_{\text{tot}} = 1,03 \text{ ml}$$

$$V_{\text{enz}} = 0,1 \text{ ml}$$

$$\varepsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$\text{Et } UI \text{ g}^{-1} = UI \text{ ml}^{-1} \times V_{\text{tot extrait enz}} \div MS_{\text{ajouté}}$$

Équation 16

avec

$$V_{\text{tot extrait enz}} = 120 \text{ ml}$$

$$MS_{\text{ajouté}} = Masse_{\text{ajouté}} \times MS\%_{\text{matrice}}$$

V.3. Mesure de l'activité Laccase

L'activité laccase est déterminée par l'oxydation de la 2,2' -Azino -bis -(3-éthyl -benzothiazoline -6-sulfonate) (ABTS, $\varepsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) d'après la procédure décrite par Wan et Li, (2010). Le mélange réactionnel contient 0,2 ml de ABTS 0,5 mM, 0,8 ml de tampon acétate de sodium 20 mM (pH 4,5) et 0,25 ml d'enzyme. L'oxydation de l'ABTS est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 420 nm.

$$UI \text{ ml}^{-1} = UI \text{ l}^{-1} \times 10^{-3} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{enz}}} \times \frac{10^6}{\varepsilon \times l} \times 10^{-3} \quad \text{Équation 17}$$

Dont

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} = \text{pente de relation linéaire entre absorbance et le temps}$$

$$V_{\text{tot}} = 1,25 \text{ ml} \quad V_{\text{enz}} = 0,25 \text{ ml}$$

$$\varepsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad l = 1 \text{ cm}$$

$$UI \text{ g}^{-1} = UI \text{ ml}^{-1} \times V_{\text{tot extrait enz}} \div MS_{\text{ajouté}} \quad \text{Équation 18}$$

Dont

$$V_{\text{tot extrait enz}} = 120 \text{ ml}$$

$$MS_{\text{ajouté}} = Masse_{\text{ajouté}} \times MS\%_{\text{matrice}}$$

V.4. Mesure de l'activité Cellulase

Les mesures ont été réalisées en suivant la méthode de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) développée par Ghose (1987). Une incubation de 1 ml de tampon citrate de

sodium de 12,903 g L⁻¹ pH 4,8, 0,5 ml d'enzyme et un papier filtre de Whatman N°1 de 50 mg est réalisée dans un tube d'essai à 50°C pendant 60 min. Les sucres solubles réducteurs (glucose) produits au cours de l'hydrolyse sont quantifiés par dosage colorimétrique au DNS (Acide 3,5-Dinitrosalicylique) selon la méthode de Miller (1959). Après ajout de DNS et ébullition pendant exactement 5 min, les échantillons sont dilués et leur absorbance est lue à 540 nm.

Deux témoins sont préparés : un témoin d'enzyme qui contient 1 ml de tampon et 0,5 ml d'enzyme et un témoin de substrat qui contient 1,5 ml de tampon et le papier filtre. Une gamme étalon du glucose est pour calculer l'activité de cellulase.

Une unité de FPU est définie comme 1 µmol de glucose libéré par minute. La quantité absolue de glucose libéré dans l'essai de FPU à la dilution critique est 2,0 mg qui correspond à 0,37 UI ml⁻¹. Donc,

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentration d'enzyme libérant 2,0 mg de glucose}} UI \text{ ml}^{-1} \quad \text{Équation 19}$$

V.5. Mesure de l'activité β-glucosidase

La solution de substrat 3,013 g.l⁻¹ de 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside est préparée dans le tampon d'acétate de sodium pH 4,8 dont la concentration est de 4,102 g.l⁻¹. Une incubation de 100 µl d'enzyme dilué et 400 µl de substrat est fait dans un tube d'essai à 50°C pendant 15 min (Dien *et al.*, 2008). La réaction enzymatique est ensuite arrêtée par l'ajout de 2 ml de solution Na₂CO₃ de 106 g l⁻¹. L'absorbance est lue à 410 nm. Une gamme étalon du p-Nitrophenol (p-NP) est pour calculer l'activité de β-glucosidase. Une unité est définie comme 1 µmol de p-NP libéré par minute.

$$UI \text{ mL}^{-1} = \frac{p\text{-NP libéré}}{0.1 \times 15} \times \text{dilution facteur} \quad \text{Équation 20}$$

C. Résultats et discussion

VI. Can BioMethane Potential (BMP) be predicted from other variables such as biochemical composition in lignocellulosic biomass and related organic residues?

BAYARD Rémy, LIU Xun, BENBELKACEM Hassen, BUFFIERE Pierre, AUBIN Jean-Baptiste, GOURDON Rémy

Université de Lyon, INSA-Lyon, Laboratoire LGCIE-DEEP, Bât. S. Carnot, 9 rue de la Physique, F-69621 VILLEURBANNE, France.

Article soumis pour publication au journal WASTE MANAGEMENT en juillet 2015

VI.1. Abstract

The potentialities of methane production by anaerobic digestion of lignocellulosic biomass depend not only on the availability of the resources on the considered territory but also on their physico-chemical characteristics. Relevant methods of characterization are therefore needed to select and possibly combine the most appropriate biomass substrates in order to optimize energy recovery through anaerobic digestion processes. The objective of the present study was to determine whether BioMethane Potential of such substrates could be predicted from a limited number of variables more rapid or easier to determine. A set of 36 biomass substrates and organic residues from a variety of origins was analyzed for total and easily hydrosoluble organic matter fractions (VS and SCOD), neutral detergent soluble fraction (SOL), hemicelluloses (HEM), cellulose (CELL), and lignin-like residual fraction (RES) fractions. Bioreactivity of all samples was also measured by experimental assays (biochemical oxygen demand - BOD, and biochemical methane potential - BMP). The whole set of data thereby obtained was analyzed statistically considering one dependent variable (BMP), and 6 explicative variables (SCOD, SOL, HEM, CELL, RES, and BOD). Partial Least Square (PLS) analysis revealed very clearly a positive correlation between BMP and BOD which were both anti-correlated with RES. On the other hand, no correlations were observed between BMP, SCOD, HEM and CELL contents. PLS analysis showed that BMP was significantly correlated to the 6 explicative variables. The most influent variables were found to be RES and BOD, and a polynomial model was successfully validated for the prediction of BMP from RES and BOD.

Keywords: Biomethane potential, biodegradation, anaerobic digestion, biomass, organic waste, lignocellulose, cellulose, lignin, correlation, statistical analysis.

Highlights:

- Biomethane potential (BMP) and Biological Oxygen Demand (BOD) were both anti-correlated with Van Soest's residual fraction (RES).
- For substrates representative of the large ranges of biochemical compositions, no clear correlations were observed between BMP, soluble COD (SCOD), hemicellulose (HEM) and (CELL) contents.
- The most influent variables to predict were found to be RES and BOD.
- A polynomial model was successfully validated for the prediction of BMP from RES and BOD.

List of abbreviations:

BD_{Aero} : Bioconversion yield under aerobic condition

BD_{Ana} : Bioconversion yield under anaerobic condition

BOD: Biological Oxygen Demand after 28 days of incubation as mass of oxygen consumed by TS or VS, in 28 days of incubation at 30°C (g kg^{-1})

BMP: Biochemical Methane production after 60 days of incubation by VS, in 60 days of incubation at 35°C (L kg^{-1})

CELL: Cellulose-like content from Van Soest sequential extraction by VS (g kg^{-1})

Cellulose: Cellulose content from NREL extraction procedure by VS (g kg^{-1})

COD_{Tot} : Total Chemical Oxygen Demand by TS ($\text{gO}_2 \text{ kg}^{-1}$)

HEM: Hemicelluloses-like content from Van Soest sequential extractions by VS (g kg^{-1})

PLS: Partial least square analysis

PRESS: Predicted residual sum of squares

R^2 : Correlation coefficient

RES: Residual lignin-like content from Van Soest sequential extractions by VS (g kg^{-1})

rRMSE : Relative root mean square error

SCOD: Soluble chemical oxygen demand by VS in leachate collected from leaching test at a L/S ratio of 10 ($\text{gO}_2 \text{ kg}^{-1}$)

SOL: Soluble Fraction from Van Soest sequential extractions by VS (g kg^{-1})

TOC: Total organic carbon by TS (g kg^{-1})

TS: Total solid

VIP : Variable importance in projection

VS: Volatile solid (g kg^{-1})

VI.2. Introduction

The progressive depletion of fossil fuels and the threats arising from global warming issues are strong incentives for the development of renewable energies. Biomass, which used to be the predominant form of primary energy used worldwide before the “industrial revolution” around 200 years ago, appears as a credible renewable resource for the direct production of energy (Biomass to Energy) or its transformation into solid, liquid or gaseous fuels (Biomass to Fuels). Various technologies are available to derive fuels from biomass materials and other organic residues. Biological processes such as anaerobic digestion are particularly well adapted for the transformation into methane of easily biodegradable residues, but also apply to more recalcitrant materials provided adequate (pre)treatments are applied.

A large variety of biomass substrates and organic residues may therefore be treated by anaerobic digestion (AD), including agricultural waste and green waste, sludge from wastewater treatment, organic fraction of household waste, food and food-processing waste, forestry waste, etc. (Buffière *et al.*, 2009). Methane production by AD was estimated in 2007 at 8.3 MTOE (million Tons oil equivalent) in Europe (0.5 MTOE in France), out of which 58 % were attributed to landfills’ biogas, 18 % to sewage sludge digestion and 24 % to the digestion of other types of waste (EurObserv’ER, 2013). The yearly production of biodegradable organic fractions of household waste in Europe (200 Mt) was estimated by Davidsson *et al.* (2007) to a potentially recoverable energy close to 18 MTOE in the form of methane. However, appropriate resources for AD are not yet fully evaluated in Europe, neither quantitatively nor qualitatively (Bidlemaier *et al.*, 2004).

The eligibility of biomass substrates to AD depends on their biodegradability which itself depends on their composition and physical characteristics. The structure of the organic matter, the presence of undesirable materials or fractions, and the biochemical composition may induce limitations in the bioconversion into biogas. Hence, the Biochemical Methane Potential (BMP) depends on structural properties (size of particles, heterogeneity, etc.) and (bio)chemical composition (Chandler *et al.*, 1980; Jeffries, 1990; Liu *et al.*, 2014, 2015. Monlau *et al.*, 2012; Noike *et al.*, 1985; Stinson and Ham, 1995; Tong *et al.*, 1990; Triolo *et al.*, 2011-2012; Xu *et al.*, 2014). The dominant factor of the observed recalcitrance in the considered substrates is considered to be the presence of lignocellulosic materials, in which cellulose, hemicelluloses and lignin are intimately combined (Fan *et al.*, 1982; Jeffries, 1990). The content in each constituent in primary biomass depends on its nature, origin and age. Cellulose forms linear polymeric chains of thousands of glucose units, which are organized in the form of microfibrilles linked to each other by hemicellulosic polymers within a 3-D reticulated network of lignin. Although hemicelluloses, and to a lesser extent cellulose (Noike *et al.*, 1985), are relatively well biodegradable, their accessibility to microbial and/or enzymatic attacks is considerably reduced by the very stable lignin polymer which acts as a protective gangue (Tong *et al.*, 1990).

Numerous studies have reported the influence of biochemical composition on BMP, particularly the negative effect of lignin content Buffière *et al.*, 2006; (Gunasselan, 2007; Triolo *et al.*, 2011; Liew *et al.*, 2012; Monlau *et al.*, 2012). Some authors have reported correlations between BMP and other parameters such as the contents in soluble organic matter, lipids and proteins, and/or hemicelluloses and cellulose. For lignocellulosic substrates, the contents in hemicelluloses + cellulose is often considered as a good indicator to estimate biodegradability, since these polymers may contribute to 90% of the biomethane potential (Rodriguez *et al.*, 2005). Lignin content is however usually seen as the predominant factor since this polymer is recalcitrant to biodegradation under anaerobic conditions (Stinson and Ham, 1995; Young and Frazer, 1987). However, the variety of experimental methods of characterization and analytical techniques used in the published studies makes it difficult to compare the results and generalize the observed correlations.

The objective of the present study was to determine on a large set of organic substrates whether a limited number of variables (or combinations of variables) which would be easier or faster to determine than BMP itself could allow its reliable prediction. The selected substrates were analyzed for organic matter content and soluble fraction, and for biochemical composition. Their biodegradability was also measured experimentally under both anaerobic (BMP) and aerobic conditions (biological oxygen demand, BOD). Results were statistically analyzed to determine the correlations between BMP and the other variables.

VI.3. Material and methods

VI.3.1. Nature, origin and preparation of samples

A variety of lignocellulosic biomass materials and related organic residues were selected to cover a wide range of characteristics in terms of nature, origin and lignocellulosic content (Table 1). The selected substrates consisted in: crop residues (S1-S6); forestry residues (S7-S11); green waste from public gardens or composting platforms (S12-S14); restauration waste (S22); fractions of municipal solid waste (MSW) collected from recycling plants (S15-S21 and S23-S25); raw MSW (S26-S28); biowaste and digestates from mechanical biological treatment plants (S29-S36). Samples of about 10 kg of each substrate were collected, homogenized on site and transported to the laboratory where they were dried at 60°C for 3 days. Samples were shredded three times with a low-speed Blik® monorotor M420 shredder and carefully homogenized. Then, an aliquot of 1 kg of each sample was crushed in a Retsch SM 200 cutting mill successively down to 4 mm, and down to 1 mm. Finally, the powdered samples thereby obtained were homogenized and stored at 3°C in closed plastic bottles until they were analyzed. All analyses were triplicated.

Table 1. Substrates designation, origin and category.

#	Designation	Nature	Origin and collection	Region and Country	Category
S1	Corn stover	<i>Zea mays</i>	Private farm <i>Residues collected on the soil 10 days after harvested</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S2	Corn bagasse	<i>Zea mays</i>	Private farm <i>Residues collected on the soil 10 days after harvested</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S3	Barley Straw	<i>Hordeum vulgare</i>	Private farm <i>Residues directly collected with harvest</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S4	Wheat Straw	<i>Triticum aestivum</i>	Private farm <i>Residues directly collected with harvest</i>	Franche-Comté, France	Agricultural residue
S5	Sugarcane bagasse #1	<i>Saccharum officinarum</i>	Artisanal Rhum distillery <i>No crushing, and sugar extraction with single roller</i>	Plaine de Cul-de-Sac, Port-au-Prince, Haiti	Agricultural residue
S6	Sugarcane bagasse #2	<i>Saccharum officinarum</i>	Industrial bioethanol refinery <i>Crushing, and sugar extraction with multi rollers</i>	Recife, Brasil	Agricultural residue
S7	Hazel branches	<i>Corylus avellana</i>	Private forest <i>Sample collected directly after cutting thin branches (diam. < 1cm)</i>	Régny - Rhône-Alpes, France	Forest residue
S8	Pseudo-acacia branches	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Private forest <i>Sample collected directly after cutting thin branches (diam. < 1 cm)</i>	Régny - Rhône-Alpes, France	Forest residue
S9	Mix Wood #1	Mix of branches	Greenwaste composting plant <i>Collected at the beginning of the composting process</i>	Décines-Charpieu, – Rhône-Alpes, France	Forest residue
S10	Mix Wood #2	Wood refuse	Green waste composting plant <i>Collected at the end of the composting process, by sieving</i>	Décines-Charpieu, – Rhône-Alpes, France	Forest residue
S11	Wood	<i>Pinus radiata</i>	Sawmill plant	Saint-Chamont, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S12	Mix Green waste #1	Mix on green waste	Composting plants <i>Sample collected at the beginning of the composting process</i>	Décines-Charpieu, – Rhône-Alpes, France	Forest residue
S13	Mix Green waste #2	Mix of leaves, yard trimmings and small pieces of branches	Campus of university <i>Sampled 3 days after green waste collected</i>	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S14	Mix Green waste #3	Mix of branches	Campus of university <i>Sampled 60 days after green waste collected</i>	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	Forest residue

S15	Newspaper	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S16	Office paper	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S17	Magazine paper	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S18	Cardboards	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S19	Cotton (Textile)	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S20	Sanitary Textile	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S21	Composites (Tetrabricks)	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S22	Food Waste	-	Waste collected from Res2	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S23	Fine fraction from RMSW	-	Waste collected from recycling plant	Lons-le-Saunier, Franche-Comté, France	MSW residue
S24	Mix papers from MSW	-	Waste collected from recycling plant	Rillieux-la-Pape, Rhône-Alpes, France	MSW residue
S25	Mix Cardboards from MSW	-	Waste collected from recycling plant	Rillieux-la-Pape, Rhône-Alpes, France	MSW residue
S26	RMSW #1	-	Waste collected from MBT plant	Ile de France, France	MSW residue
S27	RMSW #2	-	Waste collected from MBT plant	Barcelone, Spain	MSW residue
S28	RMSW #3	-	Waste collected from MBT plant	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	MSW residue
S29	Biowaste #1	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S30	Biowaste #2	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste

Partie C : Résultats et discussion

S31	Biowaste #3	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S32	Biowaste #4	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S33	Digestate from RMSW #1	-	Waste collected from AD plant	Ile de France,	MSW residue
S34	Digestate from RMSW #2	-	Waste collected from AD plant	Barcelone, Spain	MSW residue
S35	Digestate from Biowaste #1	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste
S36	Digestate from Biowaste #2	-	Waste collected from AD plant	Calais, Nord-Pas-de-Calais, France	Biowaste

N/A : not available

VI.3.2. Total and easily-soluble organic matter contents

a. Total organic matter

This variable was analyzed in order to express the results of BOD and BMP with respect to a unit mass of dry organic matter. Three different methods were used. The first method consisted in measuring the mass loss of a dry sample burnt at 550°C for 4h (AFNOR NF EN 15169, 2005). Results were denoted as VS (“volatile” Solid) and expressed in percent of Total Solid (%_{TS}). The second method was to determine the chemical oxygen demand (COD) by sulfochromic acid oxidation (ISO 14235, 1998). A known mass of sample was oxidized in a given volume of potassium bichromate (in excess) and sulphuric acid aqueous solution for 2h at 135°C. Bichromate ions were reduced to Cr³⁺ which were analyzed by spectrophotometry at 585 nm. The last method was to determine the total organic carbon content in the samples according to the standard ISO 10694 (1995), using an OI Analytical TOC analyzer equipped with infrared detection of CO₂. A known mass of sample was firstly spiked with a 15% H₃PO₄ aqueous solution to remove inorganic carbon in the form of CO₂. The organic carbon present in the sample was subsequently oxidized by a flow of di-oxygen at 950°C in the presence of a catalyst (Zirconium).

b. Easily Soluble organic matter

The protocol used was based on the one described in the European Standard leaching procedure AFNOR NF EN 12457-2 (2002): a dry mass of 100 g of sample was suspended in 1000 mL of de-ionized water and the suspension continuously mixed at room temperature (20 ± 2°C) on a rotating tumbler set at 10 rpm. After 3 hours, the suspensions were centrifuged at 9000 g for 30 min and the supernatants filtered at 0.45 µm. The solutions were then analyzed for Soluble Chemical Oxygen Demand (SCOD) according to the International Standard Procedure ISO 15705 (2002). Results were expressed as mgO₂.g⁻¹_{TS} with respect to the dry mass of the samples, and as %_{COD} to express the proportion of SCOD in the overall COD of the samples. Analytical results of total and soluble organic matter contents are shown in Table 2.

VI.3.3. Biochemical composition

The biochemical fractionation of the organic matter in the samples was achieved by successive steps of hydrolysis and extraction using different solvents according to XP U44-162 AFNOR standard procedure (2005). The protocol was developed by Van Soest and Wine (1967) and integrated Mertens’ recommendations (2002) for fiber analysis. It was conducted on aliquots of powdered dry samples corresponding to 2 g of volatile matter. At each step, the residual solids were dried and weighed, and their VS contents analyzed. Four fractions were obtained, namely (1) neutral detergent soluble fraction (SOL) extracted at the first step by a neutral detergent aqueous solution; (2) Hemicelluloses-like (HEM) extracted with a dilute acidic aqueous detergent solution; (3) Cellulose-like (CELL) extracted

with a concentrated 72% sulfuric acid solution; and (4) lignin-like residual organic matter (RES) which was not extracted in the procedure.

The results were expressed in mass % of VS, i.e. in grams of the considered constituent present in 100 g of volatile solid, according to the following equations:

$$\text{SOL} = 100 - \text{VS} (1) \quad (\text{Equation 1})$$

$$\text{HEM} = \text{VS} (1) - \text{VS} (2) \quad (\text{Equation 2})$$

$$\text{CELL} = \text{VS} (2) - \text{VS} (3) \quad (\text{Equation 3})$$

$$\text{RES} = \text{VS} (4) \quad (\text{Equation 4})$$

Where for each sample SOL, HEM, CELL and RES were respectively the “easily soluble”, “hemicelluloses-like”; the “cellulose-like”; and “lignin-like” contents (in % of volatile solid) and VS (n) the mass of volatile solids weighed after step (n) of the procedure. Analytical results of biochemical composition are shown in Table 3.

VI.3.4. Determination of biodegradability

a. Biological Oxygen Demand

The protocol used was similar to the standard procedure for BOD determinations in aqueous solutions, but here the samples were analyzed in the form of dry powders which were suspended in an aqueous nutrient solution. The protocol followed was inspired by the international procedure ISO 10707 (1994). A mass of around 100 mg of sample (the exact mass was calculated from VS content of the material) was introduced into a BOD flask and complemented with 10 mL of mineral solution, 10 mL of inoculum at 15 g_{VS}.L⁻¹), and 80 mL of de-ionized water. BOD flasks were closed with OxiTop™ manometer caps and incubated at 30 °C for at least 28 days. Carbon dioxide produced by mineralization of organic matter was trapped by sodium hydroxide pellets placed in a specific compartment in the headspace of the test flasks. Consequently, the recorded pressure decreased proportionally to the oxygen consumed and was subsequently converted into BOD values. All assays and blanks were triplicated. The results were expressed in mg of oxygen consumed by gram of total solid or volatile solid (mg_{O2}.g⁻¹_{TS or VS}). The aerobic biodegradability of the sample was calculated on the basis of the total COD of the solid sample (see Equation 5). Results are reported in Table 4.

$$BD_{Aero} = \frac{BOD \text{ (mgO}_2\text{.g}_{TS}^{-1})}{COD_{Tot} \text{ (mgO}_2\text{.g}_{TS}^{-1})} \times 100 \quad (\text{Equation 5})$$

b. Biochemical methane potential

The method used was described by Angelidaki *et al.* (2009). The nutrient medium was prepared according to ISO 11734 standard procedure (1995). The inoculum was taken from a municipal digester treating sludge from a wastewater treatment plant. An inoculum to substrate ratio of 2 was used on a VM basis. 1 g of samples were suspended in 200 mL nutrient medium and 100 mL inoculum suspension in 500 mL serum bottles. Blanks were also followed with the same composition but no samples to assess the residual methane production of the inoculum. All assays and blanks were triplicated.

To insure anaerobic conditions, the flasks were flushed for 5 minutes with a gas mixture of 70% N₂ and 30% CO₂. They were then sealed with gas-tight rubber stoppers and plastic seals, and incubated for 60 days at 35 ± 2°C in the dark. Biogas production was monitored by a manometric method using a Digitron® electronic manometer with a precision of 2 mbar and a maximum pressure of 2000 mbar. Biogas volumetric production was calculated from the monitored pressures knowing the headspace volume and the temperature of incubation, and expressed under Normal Temperature and Pressure conditions (NTP, T = 0°C and p = 1013 mbar = 1 atm) using the ideal gas relationship. Biogas composition was regularly analyzed with a micro-chromatograph Agilent® G2890A-P200H, equipped with thermal conductivity detectors, a Poraplot U column for CO₂ and H₂S separation and a Molsieve column for O₂, N₂, and CH₄. BMP was then expressed in L_{CH₄}.kg⁻¹ (TS or VS) under normal temperature and pressure conditions. Anaerobic biodegradability was calculated as the ratio between the productions of methane obtained during the tests and the theoretical maximal production calculated on the basis of the COD_{Tot} of the solid sample (see Equation 6). BMP results are reported in Table 4.

$$BD_{Anas} = \frac{BMP_{60}(NmL_{CH_4}g_{TS}^{-1})}{0.35 \times COD_{Tot}(mgO_2g_{TS}^{-1})} \times 100 \quad (\text{Equation 6})$$

VI.3.5. Statistical analysis of data

The whole set of data obtained in the study was treated by partial least square analysis (PLS) using XLSTAT software (Addinsoft, SARL, France), in the objective to identify correlations between BMP and the other variables of characterization. BMP was therefore considered as the “dependent variable”, whereas all other parameters were defined as potential “explicative variables”.

Statistical analysis was based on the construction of PLS factors (or dimensions) by minimizing for the 36 samples the covariance between the dependent variable BMP and the explicative variables. A first model was established where the whole set of “explicative variables” was considered with the objective to identify the most relevant “explicative variables”.

The quality of the model, estimated here by the difference between predicted and experimental BMP values, varies with the number of PLS factors used in the model. If the model overfits the data, then the quality of the prediction would decrease when increasing the number of variables, and conversely (Wold *et al.*, 2001). The number of PLS factors was determined through a leave-out cross-validation procedure using the ratio Q_h^2 defined as:

$$Q_h^2 = 1 - \frac{PRESS_h}{RESS_{h-1}} \quad (\text{Equation 7})$$

where $PRESS_h$ was the predicted residual sum of squares of the h^{th} factor and $RESS_h$ the residual sum of squares of the $(h-1)^{\text{th}}$ factor. The PLS factors were considered valid if their associated values of Q_h^2 were larger than $(1-0.95^2) = 0.0975$.

The respective relevance (or representativeness) of each “explicative variable” considered in the first PLS model was determined by the “Variable Importance in Projection (VIP)” method. Only variables with a VIP score close to or greater than 1 were considered relevant (Wold *et al.*, 2001).

A second model was then established with only the most relevant explicative variables thereby identified. Predictive values of BMP were calculated for the 36 substrates and compared to the respective experimental values using R^2 and relative root mean square error (rRMSE) to evaluate the validity of the models.

VI.4. Results and discussion

VI.4.1. General overview of the composition and characteristics of the substrates

The analytical results obtained for the different parameters with the 36 substrates are shown in Tables 2 and 3.

Table 2 shows that the selected substrates covered a relatively wide range of organic matter content (from 47 to 99%_{TS}) representative of the variety of composition of biomass residues. The 3 methods used for the determination of organic matter contents provided similar results for each individual substrate, thereby confirming that they were all well adapted to the typologies of materials analyzed (Liu *et al.*, 2014). The contents in water-soluble organic matter, ranging from 8 to 280 g_{O2}.kg⁻¹ vs, corresponding to 0.5 to 21.5% of Total COD, also confirmed the diversity of typologies covered by the set of substrates analyzed.

Biochemical compositions of the selected substrates are shown in Table 3. It can be seen that cellulose (CELL) and soluble (SOL) fractions were predominant in the samples, with respective mean contents

of 43.6% and 25.7% of VS. However, the 36 samples exhibited quite a wide variety of biochemical compositions that may be typically encountered in the different possible types of biomass substrates: Cellulose, hemicelluloses and lignin contents ranged between 7 and 86%_{VS} ; 1%_{VS} and 40%_{VS} , and 3 and 30%_{VS} , respectively.

Experimental evaluation of biodegradability was very reproducible both under aerobic and anaerobic conditions, with standard deviations lower than 10 % on the triplicates as shown in Table 4. To allow relevant comparisons between samples, BOD and BMP results were expressed with respect to the volatile solid content of the samples. It was observed that biodegradability clearly varied with the nature of the samples. Similar trends were observed for BOD and BMP in most substrates. This observation was reported in several recent studies (Barrena et al., 2009; Cossu et al, 2008; Ponsa, et al., 2008). However, some of the substrates with high lignin contents such as forest residues (S7-S11) and mix green waste (S12-S14) exhibited different patterns, suggesting a particular influence of lignin contents as discussed below.

Table 2. Global analyses of organic matter in the 36 biomass substrates ^a.

#	Designation	VS (%Ts)	COD (gO ₂ .kg ⁻¹ Ts)	TOC (%Ts)	SCOD (gO ₂ .kg ⁻¹ vs)	SCOD %COD %COD _{tot}
S1	Corn stover	95.5 ± 0.3	1180 ± 5	45.6 ± 2.0	129.2 ± 2.7	10.5
S2	Corn bagasse	89.4 ± 1.6	1150 ± 80	46.3 ± 1.5	115.3 ± 0.6	9.0
S3	Barley Straw	94.9 ± 0.1	1220 ± 4	51.5 ± 2.4	76.2 ± 0.4	5.9
S4	Wheat Straw	91.5 ± 0.2	1250 ± 15	42.3 ± 1.1	81.5 ± 0.6	6.0
S5	Sugarcane bagasse #1	96.8 ± 0.2	1260 ± 15	50.0 ± 1.9	280.3 ± 0.9	21.5
S6	Sugarcane bagasse #2	93.8 ± 0.2	1240 ± 15	44.5 ± 2.4	15.1 ± 0.6	1.1
S7	Hazel branches	97.3 ± 0.3	1345 ± 20	46.6 ± 0.9	59.7 ± 0.3	4.3
S8	Pseudo-acacia branches	95.7 ± 0.1	1300 ± 50	45.2 ± 2.0	113.7 ± 0.4	8.4
S9	Mix Wood #1	62.7 ± 2.5	990 ± 9	49.5 ± 2.7	41.6 ± 0.3	2.6
S10	Mix Wood #2	78.0 ± 2.2	1080 ± 50	40.1 ± 0.8	21.9 ± 0.3	1.6
S11	Wood	98.3 ± 1.2	1370 ± 15	49.2 ± 2.5	28.2 ± 0.4	2.0
S12	Mix Green waste #1	61.8 ± 0.6	889 ± 19	41.1 ± 5.9	183.3 ± 4.0	12.7
S13	Mix Green waste #2	50.4 ± 1.9	756 ± 10	35.1 ± 1.1	110.5 ± 1.2	7.4
S14	Mix Green waste #3	78.1 ± 0.1	972 ± 17	42.8 ± 7.0	234.3 ± 4.2	18.8
S15	Newspaper	81.0 ± 1.0	1077 ± 25	38.2 ± 1.1	10.2 ± 0.7	0.8
S16	Office paper	92.1 ± 1.1	1063 ± 12	36.9 ± 1.3	9.2 ± 0.6	0.8
S17	Magazine paper	54.3 ± 2.7	696 ± 25	30.3 ± 2.0	14.7 ± 0.9	1.1
S18	Cardboards	89.0 ± 1.5	1131 ± 15	40 ± 1.0	42.2 ± 1.4	3.3
S19	Cotton (Textile)	98.9 ± 1.6	1180 ± 12	42 ± 1.6	12.1 ± 0.6	1.0
S20	Sanitary Textile	98.3 ± 1.2	1240 ± 32	42.1 ± 1.8	7.9 ± 0.3	0.6
S21	Composites (Tetrabricks)	98.6 ± 1.4	1360 ± 15	45.2 ± 1.1	24.4 ± 0.4	1.8
S22	Food Waste	93.6 ± 0.1	1330 ± 25	52.1 ± 1.8	223.8 ± 0.5	15.8
S23	Fine fraction from RMSW	60.4 ± 2.3	910 ± 20	38.9 ± 1.2	179.3 ± 2	11.9
S24	Mix papers from MSW	70.6 ± 0.2	961 ± 20	35.3 ± 1.9	129.7 ± 1.3	9.5
S25	Mix Cardboards from MSW	86.5 ± 0.1	1016 ± 21	41.9 ± 3.5	42.6 ± 4.0	3.6
S26	RMSW #1	69.2 ± 0.6	885 ± 19	38.8 ± 1.9	156.0 ± 4.5	12.2
S27	RMSW #2	70.1 ± 1.7	1026 ± 10	35.4 ± 1.8	221.0 ± 1.7	15.1
S28	RMSW #3	66.9 ± 0.4	881 ± 10	38.4 ± 3.2	110.1 ± 6.2	8.4
S29	Biowaste #1	66.9 ± 1.6	933 ± 14	38.1 ± 2.0	87.9 ± 0.2	6.3
S30	Biowaste #2	56.8 ± 5.1	772 ± 10	32.1 ± 1.8	157.2 ± 0.4	11.6
S31	Biowaste #3	74.4 ± 0.2	998 ± 42	38.4 ± 2.9	195 ± 3.1	14.5
S32	Biowaste #4	73.6 ± 0.5	946 ± 32	42.1 ± 1.6	163.8 ± 5.5	12.7
S33	Digestate from RMWS #1	47.1 ± 0.5	685 ± 3	25.3 ± 1.2	19.5 ± 2.0	1.3
S34	Digestate from RMWS #2	52.5 ± 0.9	831 ± 32	25.2 ± 1.3	30.2 ± 0.2	1.9
S35	Digestate from Biowaste #1	56.6 ± 1.4	828 ± 26	31.9 ± 1.6	135.7 ± 0.6	9.3
S36	Digestate from Biowaste #2	47.3 ± 1.5	610 ± 53	21.5 ± 1.0	67.0 ± 0.1	5.2

a : Data reported as mean ± standard deviation from three replicate determinations.

Table 3. Biochemical composition of substrate samples ^a.

#	Designation	Van Soest fiber extraction			
		SOL (%vs)	HEM (%vs)	CELL (%vs)	RES (%vs)
S1	Corn stover	14.6 ± 1.5 ^b	17.6 ± 1.2 ^b	56.2 ± 2.1 ^b	11.6 ± 0.5 ^b
S2	Corn bagasse	5.5 ± 2.1	40.0 ± 2.8	49.0 ± 0.9	5.4 ± 0.2
S3	Barley Straw	12.2 ± 0.3	31.6 ± 0.5	50.1 ± 2.5	6.1 ± 2.3
S4	Wheat Straw	13.3 ± 0.9	28.2 ± 1.1	50.9 ± 0.5	7.6 ± 0.4
S5	Sugarcane bagasse #1	21.8 ± 0.3	23.1 ± 1.0	44.1 ± 4.4	11.0 ± 3.0
S6	Sugarcane bagasse #2	5.2 ± 0.9	36.7 ± 0.7	51.7 ± 0.4	6.4 ± 0.1
S7	Hazel branches	10.6 ± 0.8	15.4 ± 0.9	55.3 ± 0.5	18.7 ± 0.4
S8	Pseudo-acacia branches	18.2 ± 0.8	17.6 ± 1.3	48.1 ± 1	16.1 ± 0.3
S9	Mix Wood #1	13.7 ± 2.7	14.9 ± 4.0	45.0 ± 2.3	26.3 ± 0.9
S10	Mix Wood #2	12.1 ± 0.1	13.8 ± 1.5	46.8 ± 2.3	28.0 ± 0.8
S11	Wood	5.0 ± 0.2	15.0 ± 0.3	50.0 ± 0.8	30.0 ± 1.0
S12	Mix Green waste #1	31.8 ± 0.3	5.2 ± 2.4	38.4 ± 4.2	24.5 ± 0.6
S13	Mix Green waste #2	36.8 ± 0.5	15.8 ± 1.0	18.4 ± 1.1	29.0 ± 1.8
S14	Mix Green waste #3	42.9 ± 0.8	14.5 ± 0.8	29.0 ± 1.2	13.6 ± 1.5
S15	Newspaper	8.6 ± 0.7	8.5 ± 0.5	74.3 ± 1.1	8.6 ± 1.4
S16	Office paper	18.0 ± 1.9	2.4 ± 1.4	77.0 ± 1.1	2.6 ± 1.1
S17	Magazine paper	2.3 ± 1.5	1.1 ± 1.1	86.6 ± 2.5	10.0 ± 2.9
S18	Cardboards	18.0 ± 0.4	11.6 ± 0.4	53.5 ± 1.1	17.0 ± 1.9
S19	Cotton (Textile)	14.7 ± 0.1	1.4 ± 0.3	80.2 ± 0.8	3.7 ± 1.0
S20	Sanitary Textile	0.0 ± 0.0	14.6 ± 0.4	81.1 ± 0.8	4.4 ± 0.9
S21	Composites (Tetrabricks)	19.6 ± 0.8	21.0 ± 0.3	39.3 ± 1.2	20.1 ± 2.5
S22	Food Waste	50.9 ± 0.5	28.3 ± 1.0	12.1 ± 0.4	8.7 ± 1.3
S23	Fine fraction from RMSW	55.6 ± 3.0	13.9 ± 1.3	20.3 ± 1.5	10.2 ± 2.1
S24	Mix papers from MSW	7.1 ± 0.2	12.3 ± 0.5	59.6 ± 1.1	20.9 ± 1.2
S25	Mix Cardboards from MSW	15.4 ± 0.5	9.3 ± 0.7	59.5 ± 0.9	15.8 ± 1.1
S26	RMSW #1	24.2 ± 0.2	15.5 ± 0.7	50.8 ± 0.7	9.5 ± 0.1
S27	RMSW #2	55.5 ± 2.9	19.2 ± 3.1	15.3 ± 0.7	10.0 ± 0.1
S28	RMSW #3	40.3 ± 0.8	10.8 ± 1.1	32.0 ± 0.8	16.9 ± 1.3
S29	Biowaste #1	22.1 ± 0.6	20.7 ± 0.8	36.6 ± 2.5	20.6 ± 2.3
S30	Biowaste #2	49.4 ± 1.0	14.5 ± 1.0	26.8 ± 1.1	9.3 ± 0.3
S31	Biowaste #3	28.0 ± 0.9	11.0 ± 1.0	44.0 ± 2.1	17.0 ± 1.9
S32	Biowaste #4	37.6 ± 1.4	11.3 ± 0.7	34.6 ± 1.4	16.6 ± 1.6
S33	Digestate from RMWS #1	40.2 ± 1.5	25.9 ± 2.6	6.6 ± 1.0	27.2 ± 1.0
S34	Digestate from RMWS #2	67.7 ± 1.1	8.0 ± 1.7	8.4 ± 1.0	16.0 ± 1.1
S35	Digestate from Biowaste #1	41.6 ± 0.7	8.8 ± 1.1	24.0 ± 1.1	25.6 ± 1.0
S36	Digestate from Biowaste #2	64.5 ± 1.3	7.3 ± 2.2	12.3 ± 3.1	15.9 ± 2.3

a : Data reported as mean ± standard deviation from three replicate determinations.

Table 4. Experimental determinations of biological oxygen demand (BOD) and biochemical methane potential (PBM) ^a.

#	Designation	BOD (gO ₂ kg ⁻¹ TS)	BOD (gO ₂ kg ⁻¹ VS)	BD _{Aero} (%COD)	BMP (L kg ⁻¹ TS)	BMP (L kg ⁻¹ VS)	BD _{Ana} (%COD)
S1	Corn stover	893 ± 8	935 ± 9	75.9	292 ± 3	306 ± 3	70.9
S2	Corn bagasse	889 ± 2	994 ± 2	77.5	315 ± 16	353 ± 18	78.5
S3	Barley Straw	787 ± 28	829 ± 30	64.6	264 ± 2	278 ± 2	61.8
S4	Wheat Straw	871 ± 5	952 ± 5	69.8	296 ± 14	324 ± 15	67.8
S5	Sugarcane bagasse #1	750 ± 22	775 ± 24	59.4	244 ± 5	252 ± 5	55.2
S6	Sugarcane bagasse #2	620 ± 39	660 ± 41	50.0	211 ± 21	225 ± 22	48.6
S7	Hazel branches	482 ± 24	495 ± 25	35.9	95 ± 2	97 ± 2	20.2
S8	Pseudo-acacia branches	835 ± 8	873 ± 8	64.5	145 ± 2	151 ± 2	31.9
S9	Mix Wood #1	433 ± 40	690 ± 64	43.9	62 ± 4	99 ± 6	18.0
S10	Mix Wood #2	375 ± 23	481 ± 29	34.8	55 ± 5	70 ± 6	14.6
S11	Wood	129 ± 11	131 ± 12	9.4	16 ± 1	16 ± 1	3.3
S12	Mix Green waste #1	195 ± 14	316 ± 10	21.9	39 ± 4	64 ± 7	12.5
S13	Mix Green waste #2	360 ± 23	714 ± 45	47.6	69 ± 5	137 ± 10	26.1
S14	Mix Green waste #3	678 ± 6	868 ± 8	69.8	138 ± 13	177 ± 16	40.6
S15	Newspaper	708 ± 17	874 ± 21	65.7	142 ± 5	175 ± 6	37.7
S16	Office paper	901 ± 36	978 ± 39	84.8	273 ± 6	295 ± 7	73.4
S17	Magazine paper	422 ± 30	777 ± 55	60.6	157 ± 8	289 ± 15	64.4
S18	Cardboards	789 ± 39	886 ± 44	69.8	221 ± 8	248 ± 9	55.8
S19	Cotton (Textile)	780 ± 31	789 ± 31	66.1	275 ± 9	278 ± 9	66.6
S20	Sanitary Textile	680 ± 22	691 ± 22	54.8	266 ± 2	271 ± 2	61.3
S21	Composites (Tetrabricks)	576 ± 12	584 ± 12	42.4	148 ± 20	150 ± 20	31.1
S22	Food Waste	933 ± 40	997 ± 43	70.2	268 ± 11	286 ± 12	57.6
S23	Fine fraction from RMSW	747 ± 38	1237 ± 63	82.1	199 ± 6	329 ± 10	62.5
S24	Mix papers from MSW	523 ± 14	741 ± 20	54.4	106 ± 14	150 ± 20	31.5
S25	Mix Cardboards from MSW	702 ± 20	812 ± 23	69.1	140 ± 6	162 ± 7	39.4

Partie C : Résultats et discussion

S26	RMSW #1	727 ± 53	1051 ± 77	82.1	157 ± 1	228 ± 1	50.7
S27	RMSW #2	724 ± 10	978 ± 13	70.6	287 ± 4	410 ± 10	79.9
S28	RMSW #3	752 ± 2	1125 ± 9	85.4	138 ± 4	207 ± 6	44.8
S29	Biowaste #1	389 ± 10	581 ± 15	41.7	132 ± 6	197 ± 8	40.4
S30	Biowaste #2	664 ± 17	1054 ± 27	86.0	146 ± 2	257 ± 4	54.0
S31	Biowaste #3	555 ± 14	746 ± 24	55.6	107 ± 9	144 ± 13	30.63
S32	Biowaste #4	441 ± 20	600 ± 8	46.6	108 ± 11	146 ± 14	32.62
S33	Digestate from RMWS #1	210 ± 40	446 ± 85	30.7	35 ± 1	75 ± 3	14.6
S34	Digestate from RMWS #2	167 ± 15	316 ± 28	20.1	65 ± 1	124 ± 2	22.3
S35	Digestate from Biowaste #1	164 ± 11	290 ± 19	19.8	64 ± 1	112 ± 0.5	22.1
S36	Digestate from Biowaste #2	225 ± 25	476 ± 53	44.1	56 ± 0.5	118 ± 0.5	31.4

a : Data reported as mean ± standard deviation from three replicate determinations.

VI.4.2. Prediction of BioMethane Potential

a. Evaluation of the correlations within the variables and the samples

Figure 1 shows the correlation circle and the distribution of the variables (Fig. 1A) and samples (Fig 1B). Each vector in Fig. 1 was associated to one variable or sample respectively. The position of the vectors with respect to the circle of correlation was used as an indicator of the significance of the associated variables in the considered dimension. The closer the vector was to the circle of correlation, the higher the relevance of the corresponding variable was to the dimension.

Fig. 1A revealed that SCOD and HEM were not well represented by dimensions t1 and t2, unlike BOD, BMP, and RES which were strongly related to dimension t1, and SOL and CELL to dimension t2. The correlation between 2 variables was determined from the angle between their vectors. Typically, the vectors of totally independent variables would make an angle of 90°, as observed for SOL and CELL which were found independent of both BMP and BOD as shown in Fig. 1A. BOD and BMP were found to be very positively correlated, whereas RES was very much anti-correlated to BMP. Moreover, the organic soluble contents, including SCOD and SOL were together independent variables, and showed low correlation with BOD and BMP.

The negative correlation between “lignin-like” content and BMP confirmed the work from other authors. Triolo et al. reported a negative effect of lignin content on BMP for energy crops (grass, maize, and straw) and animal manure (2011), and 57 herbaceous and non-herbaceous substrates (2012). Xu et al. (2014) also showed a strong negative correlation between lignin content and BMP using a large set of data collected from recent publications. Several articles (Liew et al., 2011; Xu et al., 2014) also reported a correlation between BMP and cellulose content, which was not observed in the present study. For example, Xu et al. (2014) showed a very strong correlation between BMP and cellulose content using principal component analysis (PCA). Triolo et al. (2011) showed a certain correlation between BMP and CELL, but not as strong as with lignin content. They concluded that the prediction of BMP was not possible from cellulose content alone. Our study clearly confirmed no correlation at all between BMP and cellulose content (Fig 1A). Since cellulose is known to be biodegradable under anaerobic conditions (references), this observation suggested that the interaction with lignin protected very efficiently cellulose from the attack of bacteria and enzymes in the selected substrates.

Figure 1 also showed a weak correlation of BMP with the soluble fractions SOL (extracted in neutral detergent aqueous solution in Van Soest procedure) and SCOD (extracted in de-ionized water). Some authors reported even negative correlations between BMP and the extractable fractions in water and ethanol (Xu et al., 2014). Others reported significant correlations between BMP and the soluble fractions of lignocellulosic materials (Monlau et al., 2012) or waste activated sludge (Motte et al., 2010).

The somehow intermediate result of our study (weak correlation) may be explained by the larger number of substrates analyzed and the much wider range of composition as illustrated by Figure 1B for samples scores on dimensions t1 and t2. Biodegradability varied according to the nature and origin, of the samples, ranging from 9.4% to 97.6% of total COD under aerobic conditions, and from 3.3 to 84.5% under anaerobic conditions. For most samples, BOD and BMP were strongly correlated, indicating that if a sample is easily biodegradable under aerobic condition, it will also be so under anaerobic conditions. This trend was reported in many previous studies (Barrena et al., 2009; Cossu et al., 2008; Ponsá et al., 2008). However, significant differences were observed for some substrates such as forest materials (S7-S11) and mix green waste (S12-S14) with relatively high lignin-like contents ranging from 16 to 30% vs.

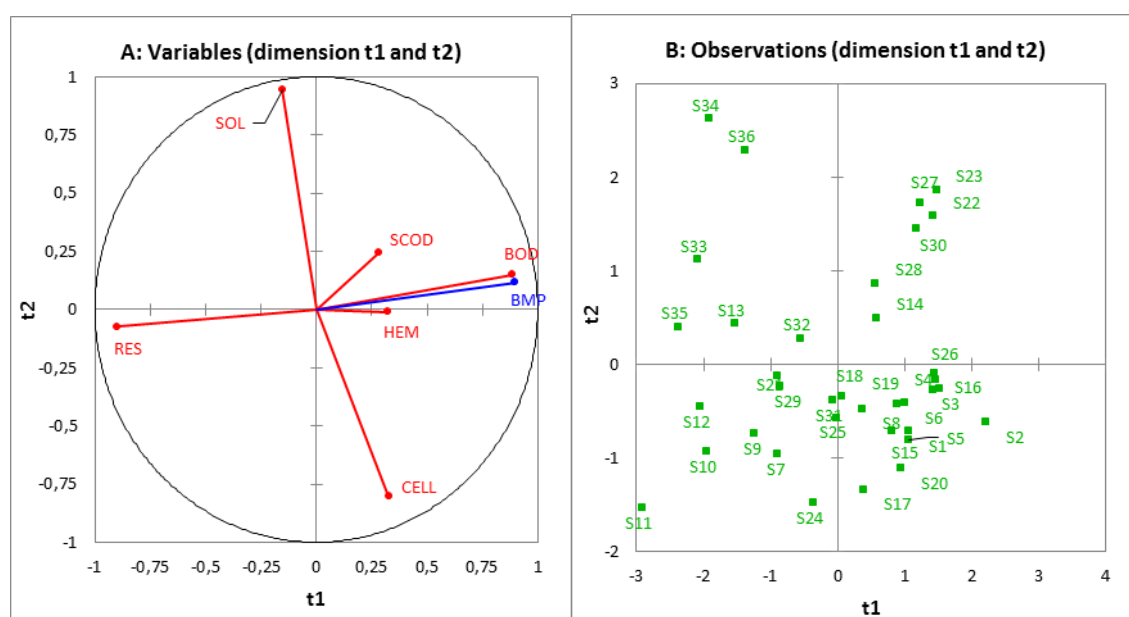


Figure 1: Plot of the loadings of variables' and samples' scores with dimensions 1 and 2 (t1 x t2).

b. PLS model # 1 with all explicative variables

A first PLS model was established to express BMP as a function of the 6 explicative variables (SCOD, SOL, HEM, CELL, RES, and BOD). The best fit between predicted and experimental values of BMP for the whole set of the samples was obtained with the following equation:

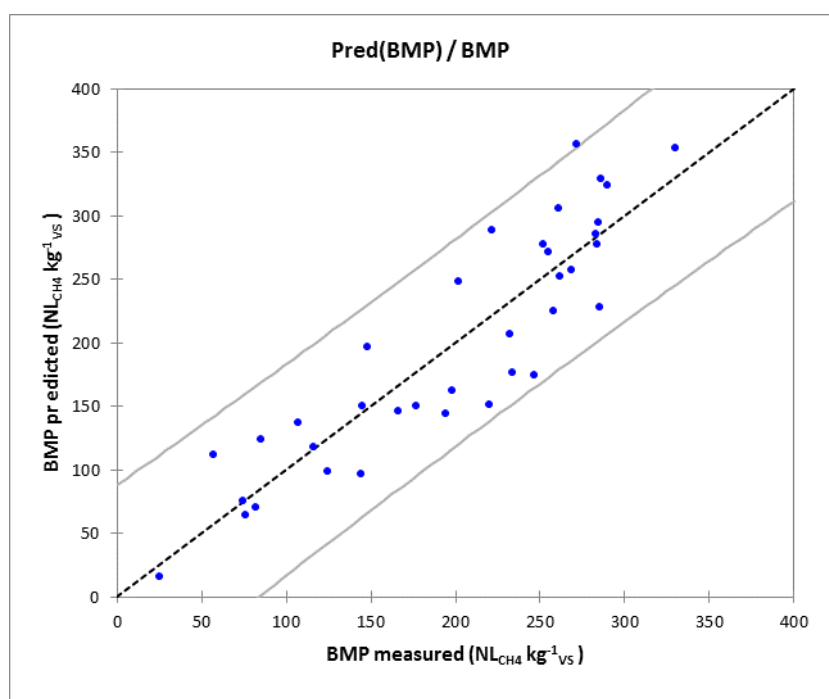
$$\text{BMP} = 109.62 - 5.19 \cdot \text{RES} + 0.15 \cdot \text{BOD} + 1.50 \cdot \text{HEM} + 0.52 \cdot \text{CELL} + 1.80 \cdot \text{SCOD} - 0.12 \cdot \text{SOL}$$

(Equation 8)

Figure 2 shows the regression line of measured BMP versus predicted BMP according to model 1. It can be seen that all the data were included within a 95% confidence interval statistically highly significant with a good regression coefficient R^2 of 0.810 and a relatively low value of rSMEP of 39 $\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{ kg}^{-1}$ vs (see Table 6).

Table 5. Q_h^2 ratio for the leave-out cross validation procedure with variables and biochemical methane potential (PBM).

Dimension	PLS Model 1	PLS Model 2
Dim1	0,765	0.804
Dim2	-0,091	-0.024
Dim3	-0,075	
Dim4	-0,073	
Dim5	-0,033	
Dim6	-0,020	



Model equation: PLS Model #1

$$\text{BMP} = 109.62 - 5.19 \cdot \text{RES} + 0.15 \cdot \text{BOD} + 1.50 \cdot \text{HEM} + 0.52 \cdot \text{CELL} + 1.80 \cdot \text{SCOD} - 0.12 \cdot \text{SOL}$$

Figure 2: Regression line for PLS Model 1 with confidence interval of 95%.

Table 6. Correlation coefficients R^2 and relative root mean square error (rRMSE) calculated from PLS Models 1 and 2, linear regression models RES and BOD versus BMP.

	PLS #1	PLS #2	RES	BOD
R^2	0.810	0.813	.707	.637
rMSEP ($NL\ kg^{-1}\ vs$)	39.0	38.7	49.8	55.5

c. BMP predictive model using a limited number of explicative variables model 2

PLS analysis was used to evaluate which of the explicative variables exhibited the major influence on the dependent variable BMP. In other terms, the objective was to find the best compromise between the number of variables used in the correlation model and the validity of the model to predict the BMP of each of the substrates.

VIP scores were calculated for each explicative variable used in “model 1” in order to evaluate their influence on the predicted BMP (Figure 3). RES and BOD were found to be the most relevant variables, with VIP scores greater than 1. On the contrary, SCOD, SOL, HEM, and CELL were shown to be much less relevant. The following equation provided the best quality of predictions for the set of the 36 substrates analyzed:

$$BMP = 161.36 - 5.91 \cdot RES + 0.169 \cdot BOD \quad (\text{Equation 9}).$$

The coefficient R^2 for the regression line of predicted vs. experimental BMP (Fig. 4) was found equal to 0.813 and the relative root mean square error (rRMSE) to 38.7 $NL\ kg^{-1}\ vs$. These values were very close to those obtained with model 1, indicating that the quality of the predictive model based on lignin content and DBO was at least as good as model 1 with all 6 variables.

Simple regressions between BMP and each of the two variables RES and BOD were done separately to evaluate the respective significance of each variable. R^2 were found to be rather low (Table 6) with 0.707 for $BMP = f(RES)$, and 0.637 for $BMP = f(BOD)$. It was concluded that each variable did not carry enough information to allow a good prediction of BMP alone, but the 2 variables provided complementary information. The combination of the 2 therefore improved the quality of BMP predictions.

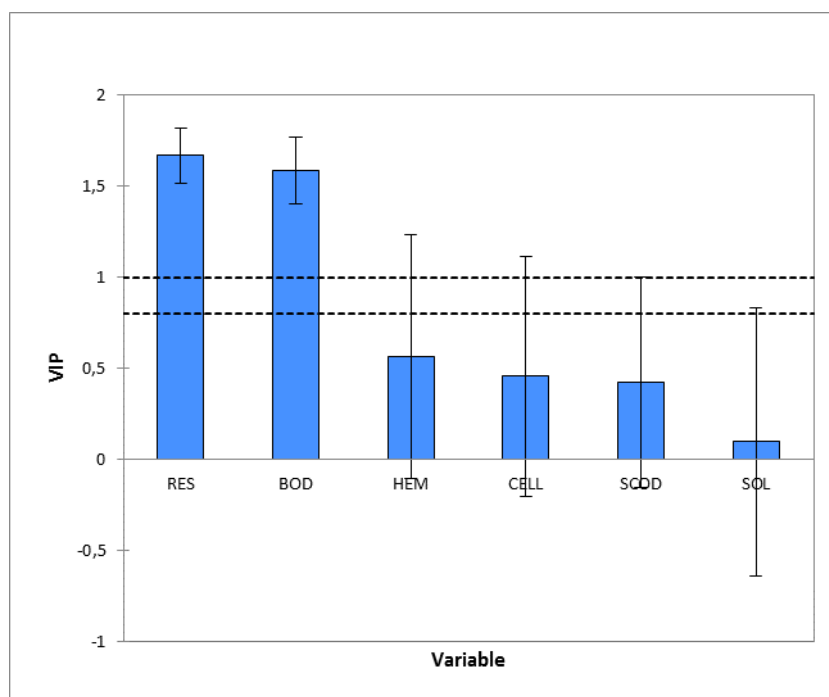
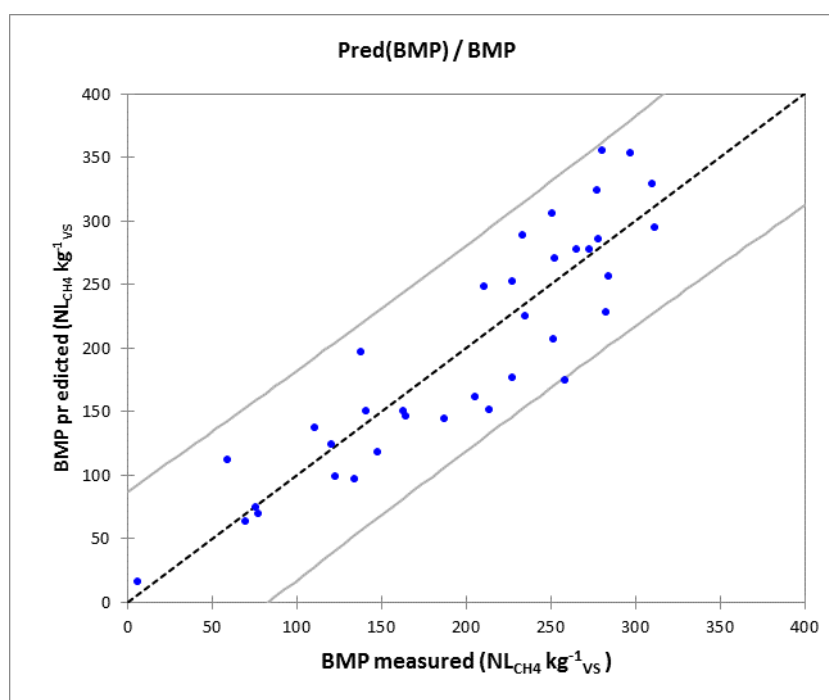


Figure 3: VIP score on variables with one PLS dimension and confidence interval of 95%.



Model equation: PLS Model #2

$$\text{BMP} = 161.36 - 5.91 \cdot \text{RES} + 0.169 \cdot \text{BOD}$$

Figure 4: Regression line for PLS Model 2 with confidence interval of 95%.

VI.5. Conclusion

The design and implementation of anaerobic digestion processes for methane recovery from biomass substrates and other organic residues require reliable determination of substrates' biomethane potentials. Experimental determinations are relatively time consuming and require certain technical skills to ensure the accuracy and reliability of the results. Although many studies already reported the effects of biochemical composition of the substrates on their methane potential, no single variable was yet shown to allow alone a good prediction of the BMP. In the present study, 36 substrates representative of the large ranges of biochemical compositions encountered in practice were analyzed for biochemical composition and biodegradability under aerobic and anaerobic conditions. Statistical analysis of the whole set of data thereby generated showed that the methane potentials of the 36 substrates could be predicted with a good accuracy from their contents in lignin and their BOD. A combination of one composition variable (lignin content) and one variable of bio reactivity was therefore found necessary to achieve good predictions. Combinations of composition variables alone were unsuccessful to predict BMP. These two variables recovered enough data to estimate BMP and leads to a faster and easier laboratory work, compared to the BMP tests which are more dependent to various parameters including the origin of sludge management, inoculum to substrate ratio, duration, biogas quantification and methane analysis. "Lignin-like" RES content can be easily determined, with a faster procedure with direct quantification of residual fraction after attack with concentrated 72% sulfuric acid solution, without the need of sequential extractions to quantify SOL, CELL and HEM. BOD test can be managed with a manometric setup to measure pressure drop in function of oxygen consumed, without need of gas sampling for analysis, and a gain of incubation time.

Our observations suggested that the composition of an organic substrate is not fully determinant of its biodegradability. Other parameters such as the structural organization of the biopolymers and other constituents in the substrates are probably key factors. They can be determined with physical analytical tools (IR, RMN, etc.) or estimated indirectly by the determination of aerobic biodegradation (BOD), which is more rapid and usually easier to implement than the experimental measurement of BMP itself.

VI.6. References

AFNOR NF EN 12457-2 2002. Caractérisation des déchets - Lixiviation - Essai de conformité pour lixiviation des déchets fragmentés et des boues - Partie2 : essai en bâchée unique avec un rapport liquide-solide de 10 l/kg et une granularité inférieure à 4 mm (sans ou avec réduction de la granularité). AFNOR, La Plaine Saint-Denis (Fr).

AFNOR XP U44-162 2005. Amendements organiques et supports de culture - Fractionnement biochimique et estimation de la stabilité biologique. Méthode de caractérisation de la matière organique par solubilisations successives. AFNOR, La Plaine Saint-Denis (Fr).

AFNOR NF EN 15169 2005. Caractérisation des déchets - Détermination de la perte au feu des déchets, des boues et des sédiments. Mesure de la teneur en résidu calciné par calcination à 550°C. AFNOR, La Plaine Saint-Denis (Fr).

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J., Guwy, A., et al., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci Technol.*, 59(5), 927-34.

Barrena, R., d'Imporzano, G., Ponsá, S., Gea, T., Artola, A., Vázquez, F., Sánchez, A., Adani, F. 2009. In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical-biological treated waste. *Journal of Hazardous Materials*. 169, 1065–1072.

Bidlingmaier, W., Sidaine, J.-M., Papadimitriou, E.K. 2004. Separate collection and biological waste treatment in the European Community. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3, 307-320.

Buffière, P., Loisel, D., Bernet, N., Delgenes, J.-P., 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Sci. Technol.*, 53(8), 233–241.

Buffière, P., Bayard, R., Germain, P., 2009. Freins au développement de la filière biogaz : les besoins en recherche et développement. ETUDE RECORD N° 07-0418/1A. Rapport final. 92 p.

Chandler, J. A., Jewell, W.J., Gossett, J. M., 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. *Biotechnol. Bioengin. Symp. Ser.* 10, 93–107.

Cossu, R., Raga, R., 2008. Test methods for assessing the biological stability of biodegradable waste, *Waste Manage.* 28, 381–388.

Davidsson, A., Gruvberger, C., Christensen, T.H., Hansen, T.L. Jensen, J.L.C. 2007. Methane yield in source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Waste Manage.* 27, 406-414.

EurObserv'ER, 2013 -http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/barobilan/barobilan13-fr.pdf.

Fan, L.T., Young-Hyun, Lee, Gharpuray, M.M., 1982. The Nature of Lignocellulosics and Their Pretreatments for Enzymatic Hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*, 23, 157-187.

Gunaseelan, V.N., 2007. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition. *Bioresour Technol.* 98(6), 1270-1277.

ISO 10694, 1995. Soil quality - Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 10707, 1994. Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 11734, 1995. Water quality - Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge - Method by measurement of the biogas production. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.1995.

ISO 14235, 1998. Soil quality - Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 15705, 2002. Water quality -- Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD) -- Small-scale sealed-tube method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jeffries, T. W. 1990. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*. 1, 163-176.

Liew, LN, Shi, J, Li, Y. 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy*. 46(0):125-32.

Liu, X., Bayard, R., Benbelkacem, H., Buffiere, P., Gourdon, R., 2014. Évaluation du potentiel biométhanogène de biomasses lignocellulosiques. *Déchets, Sciences et Techniques*. 67, 37-48.

Liu, X., Bayard, R., Benbelkacem, H., Buffiere, P., Gourdon, R., 2015. Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics. Accepted.

Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. Assoc. Off. Assoc. Chem. Int.* 85, 1217–1240.

Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X. M., Latrille, E., Trably, E., Steyer, J.-P., Carrere, H. 2012. Predictive models of biohydrogen and biomethane production based on the compositional and structural features of lignocellulosic materials. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 12217-25.

Motte, J.-C., Escudié, R., Beauvils, N., Steyer, J.-P., Bernet, N., Delgenès, J., Dumas C., 2014. Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. *Ind. Crops Prod.*, 52, 695–701.

Noike, T., Endo, G., Chang, J.E., Yaguchi, J.I., Matsumoto, J.I., 1985.Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1482–1489.

Ponsá, S., Gea, T., Alerm, L., Cerezo, J., Sánchez, A., 2008. Comparison of aerobic and anaerobic stability indices through a MSW biological treatment process, *Waste Manage.*, 28, 2735–2742.

Rodriguez, C., Hilgsmann, S., Ongena, M., Charlier, R., Thonart, P. 2005. Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation*. 16, 415-422.

- Stinson, J.A., Ham, R. K., 1995. Effect of lignin on the anaerobic decomposition of cellulose as determined through the use of a biochemical methane potential method. *Environ.Sci. Technol.* 29, 2305-2310.
- Tong, X., Smith, L. H., McCarty, P.L., 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, 21, 239-255.
- Triolo, J.M., Pedersen, L., Qu, H., Sommer, S.G., 2012. Biochemical methane potential and anaerobic biodegradability of non-herbaceous and herbaceous phytomass in biogas production. *Bioresource Technology*, 125, 226–232.
- Triolo, J. M., Sommer, S. G., Maller, H. B., Weisbjerg, M. R., Jiang, X. Y., 2011. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: Influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresour. Technol.* 102, 9395-9402.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV Determination of plant cell wall constituents. *J. Ass. Official Agr. Chem.* 56, 50-55.
- Wold, S, Sjöström, M, Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 58, 109-130.
- Xu, F, Wang, Z.W., Li, Y., 2014. Predicting the methane yield of lignocellulosic biomass in mesophilic solid-state anaerobic digestion based on feedstock characteristics and process parameters. *Bioresour. Technol.* 173, 168-76.
- Young, L.Y., Frazer, A.C., 1987. The Fate of Lignin and Lignin-Derived Compounds in Anaerobic Environments. *Geomicrobiology Journal*. 5 (3-4), 261-293.

VII. Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics

Xun LIU, BAYARD Rémy, BENBELKACEM Hassen, BUFFIERE Pierre, GOURDON Rémy

Université de Lyon, INSA-Lyon, Laboratoire LGCIE-DEEP, Bât. S. Carnot, 9 rue de la Physique, F-69621 VILLEURBANNE, France.

Article publié au Journal BIOMASS & BIOENERGY 81 (2015) 534-543

VII.1. Abstract

Biochemical composition and reactivity are key factors controlling the biodegradability of lignocellulosic residues. In the present study, 14 lignocellulosic substrates including 6 agricultural and 8 forest residues were analyzed for 9 biochemical characteristics, including BioMethane Potential (BMP), Biological Oxygen Demand (BOD), Enzymatic Cellulose Degradation tests (ECD), Van Soest and NREL fractionation methods. The data obtained were exploited by principal component analysis (PCA) and other statistical methods to investigate the possible correlations between the parameters. The study showed that the contents in particular lignin or in non-extractible residues (RES) were the characteristics which influenced most the anaerobic biodegradability (BMP), while the influence of the soluble fraction was quite low. BMP was well correlated with the ratio of the contents in non-lignin over lignin fractions and the cellulose to lignin ratio. Regarding agricultural residues, BMP was better correlated with lignin content than with RES content. Agricultural and forest residues exhibited distinct characteristics of aerobic and anaerobic biodegradability. Good correlation was observed between ECD and lignin content. Finally, it was also observed that Van Soest's and NREL methods did not provide the same results in terms of biochemical composition.

Keyword: anaerobic digestion, biomethane potential, lignocellulosic residues, biochemical analyses, biological oxygen demand, enzymatic hydrolysis

Highlights:

- Water soluble organic fraction was poorly correlated to aerobic or anaerobic biodegradability of biomass residues
- Non-extractible residues (RES) were the characteristics which influenced most the anaerobic biodegradability (BMP) on agricultural and forest residues

- BMP was well correlated with the ratio of the contents in non-lignin over lignin fractions and the cellulose to lignin ratio.
- Agricultural and forest residues exhibited distinct characteristics of aerobic and anaerobic biodegradability
- Good correlation was observed between Enzymatic Cellulose Degradation (ECD) and lignin content.

List abbreviations:

ADF: Acid Detergent Fiber

ADL: Acid Detergent Lignin

BD_{Aero} : Bioconversion yield under aerobic condition

BD_{Ana} : Bioconversion yield under anaerobic condition

BOD₂₈: Biological Oxygen Demand as mass of oxygen consumed by VS, in 28 days of incubation at 30°C (g kg⁻¹)

BMP₆₀: Biochemical Methane production by VS, in 60 days of incubation at 35°C (L kg⁻¹)

CELL: cellulose content from Van Soest sequential extraction by VS (g kg⁻¹)

Cellulose: cellulose content from NREL extraction procedure by VS (g kg⁻¹)

COD_{Tot}: Total Chemical Oxygen Demand by TS (g kg⁻¹)

COD_{Sol}: Chemical Oxygen Demand by VS in leachate collected from leaching test at a L/S ratio of 10 (g kg⁻¹)

ECD: Enzymatic Cellulose Digestibility by VS (g kg⁻¹)

EThOH: ethanol extractable fraction from NREL extraction procedure by VS (g kg⁻¹)

HEM: hemicellulose content from Van Soest sequential extractions by VS (g kg⁻¹)

Hemicellulose: hemicellulose content from NREL extraction procedure by VS (g kg⁻¹)

Lignin: lignin content from NREL extraction procedure by VS (g kg⁻¹) NDF: Neutral Detergent Fiber

RES: residual content from Van Soest sequential extractions by VS (g kg⁻¹)

SOC: Soluble Organic Carbon by VS (g kg⁻¹)

SOL: Soluble Fraction from Van Soest sequential extractions by VS (g kg⁻¹)

TOC: Total Organic Carbon by TS (g kg⁻¹)

TS: Total Solid

VS: Volatile Solid (g kg⁻¹)

WAT: water extractable fraction from NREL extraction procedure by VS (g kg⁻¹)

VII.2. Introduction

Energy recovery from lignocellulosic biomass is one of the major options to reduce greenhouse gases emissions and the depletion of fossil fuels without causing direct competition with food products. Several processes are possible to meet this objective. Microbial Anaerobic Digestion (AD) into methane is one of the most attractive approaches as compared to typical pathways to biodiesel or ethanol. It is known that in AD processes biopolymers are converted into simple compounds and finally into methane and carbon dioxide through the activity of the different types of anaerobic microorganisms. To date, AD has essentially been developed for the treatment of animal manure, municipal solid waste, sewage sludge and energy crops [1]. Yet, large amounts of lignocellulosic biomass such as crop residues and forest residues remain available in Europe and other countries as a potential resource to increase the production of renewable fuels [2, 3].

Due to the diversity of vegetable species and growth conditions however, the biochemical composition of biomass substrates is quite variable both qualitatively and quantitatively [4]. Lignocellulosic biomass is mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin, with cellulose being the most abundant natural carbohydrate polymer. The variability in biochemical composition and structural characteristics, along with other parameters, make quite variable and not easily predictable the potential production of methane by biological anaerobic digestion of these substrates. Therefore, detailed analyses of feedstocks are required to estimate the anaerobic biodegradability of lignocellulosic biomass. Several methods of chemical characterization are available, such as elemental analysis biochemical fiber analysis, enzymatic hydrolyses and experimental evaluations of biodegradability. Several studies have already investigated for various biomasses the relationships between biodegradability and some biochemical characteristics of the substrates, including proteins, lipids, carbohydrates and fibers contents [5-15]. Methane production from lignocellulosic biomass in AD process is however strongly affected by the structure of the lignocellulosic complex where the relatively recalcitrant lignin limits the accessibility to micro-organisms of hemicelluloses and cellulose which are intrinsically more easily biodegradable [18]. Fewer studies have investigated the effects of structural features such as the crystallinity of cellulose [13-15]. All of them have confirmed the negative impact of lignin content on methane production by anaerobic digestion. A recently published study explored the prediction of methane yield in mesophilic solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks using multiple linear regression and artificial neural network statistical models [15]. The authors underlined the effect of feedstock types on anaerobic digestibility, and divided the substrates into “herbaceous biomass” showing low lignin content and high digestibility and “woody biomass” with high lignin content and low methane yield. A previous study [1] reported similar observations with “non-herbaceous biomass” was characterized by high lignin content and

high concentration of crystalline cellulose. However, due to other parameters, lignin content alone was not sufficient to estimate methane potential, in particular for non-herbaceous biomass.

The present study investigated the anaerobic biodegradability of a variety of agriculture and forest by-products and their respective global characteristics (organic content including volatile solid, chemical oxygen demand, soluble organic content), and biochemical characteristics. Two types of lignocellulosic feedstocks were selected, namely crop residues (wheat straws, corn stover and corn stem, sugarcane bagasses), and wood residues (softwood branches, hardwood waste from a composting plant, hazel tree and acacia branches). Several alternative methods were used to quantify organic content, characterize organic fraction, and evaluate biodegradability. Compositional characteristics measured on the substrates studied were gathered and their correlation with biomethane potential investigated using statistical methods.

VII.3. Materials and Methods

VII.3.1. Collection and preparation of biomass substrates

Fourteen lignocellulosic biomass substrates were selected to cover a wide range of biochemical profiles. They were collected from agricultural sites, forests and green waste composting plants as indicated in Table 1. Samples of about 10 kg of each substrate were collected, mixed and transported to the laboratory where they were dried at 60°C for 3 days, shredded three times with a low-speed shredder Blik® monorotor M420, and sieved to 10 mm to obtain homogenous coarse powders. Each powdered sample was mixed and further grinded using a cutting mill Retsch® SM 200 and sieved to 4 mm. The operation was repeated and the last sieving was done to 1 mm to obtain fine powders which were stored at 2°C in closed glass flasks until they were analyzed. All analyses were performed in triplicates for each sample.

Table 1. Substrates designation, origin and category.

#	Designation	Nature	Collect time	Age	Geo-coordinates	Altitude (m)	Origin and collection	Region and Country	Category
S1	Corn stover	<i>Zea mays</i>	October 2012	6.5 months	49°23'17"N 2°08'28"E	100	Private farm <i>Residues collected on the soil 10 days after harvested</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S2	Corn bagasse	<i>Zea mays</i>	October 2012	6.5 months	49°23'17"N 2°08'28"E	100	Private farm <i>Residues collected on the soil 10 days after harvested</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S3	Barley Straw	<i>Hordeum vulgare</i>	Juin 2011	8 months	49° 25' 49" N 2° 05' 43" E	115	Private farm <i>Residues directly collected with harvest</i>	Picardie, France	Agricultural residue
S4	Wheat Straw	<i>Triticum aestivum</i>	Juin 2013	8 months	47° 37' 23" N 6° 09' 21" E	294	Private farm <i>Residues directly collected with harvest</i>	Franche-Comté, France	Agricultural residue
S5	Sugarcane bagasse #1	<i>Saccharum officinarum</i>	May 2009	N/A	18° 32' 24" N 72° 20' 24" W	50	Artisanal Rhum distillery <i>No crushing, and sugar extraction with single roller</i>	Plaine de Cul-de-Sac, Port-au-Prince, Haiti	Agricultural residue
S6	Sugarcane bagasse #2	<i>Saccharum officinarum</i>	September 2011	N/A	8° 03' 14" S 34° 52' 51" W	20	Industrial bioethanol refinery <i>Crushing, and sugar extraction with multi rollers</i>	Recife, Brasil	Agricultural residue
S7	Hazel branches	<i>Corylus avellana</i>	October 2013	2 years	45° 59' 30" N 4° 12' 56" E	350	Private forest <i>Sample collected directly after cutting thin branches (diam. < 1cm)</i>	Régny - Rhône-Alpes, France	Forest residue
S8	Pseudo-acacia branches	<i>Robinia pseudoacacia</i>	October 2013	2 years	45° 59' 30" N 4° 12' 56" E	350	Private forest <i>Sample collected directly after cutting thin branches (diam. < 1 cm)</i>	Régny - Rhône-Alpes, France	Forest residue
S9	Mix Wood #1	Mix of branches	May 2011	N/A	45° 46' 10" N 4° 57' 34" E	180	Greenwaste composting plant <i>Collected at the beginning of the composting process</i>	Décines-Charpieu, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S10	Mix Wood #2	Wood refuse	May 2011	N/A	45° 46' 10" N 4° 57' 34" E	180	Green waste composting plant <i>Collected at the end of the composting process, by sieving</i>	Décines-Charpieu, Rhône-Alpes, France	Forest residue

S11	Wood		<i>Pinus radiata</i>	October 2010	N/A	45° 28' 39" N 4° 30' 55" E	800	Sawmill plant	Saint-Chamont, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S12	Mix waste #1	Green	Mix on green waste	March 2011	N/A	45° 46' 10" N 4° 34' 34" E	180	Composting plants <i>Sample collected at the beginning of the composting process</i>	Décines-Charpieu, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S13	Mix waste #2	Green	Mix of leaves, yard trimmings and small pieces of branches	May 2011	N/A	45° 46' 00" N 4° 49' 49" E	170	Campus of university <i>Sampled 3 days after green waste collected</i>	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	Forest residue
S14	Mix waste #3	Green	Mix of branches	April 2011	N/A	45° 46' 00" N 4° 49' 49" E	170	Campus of university <i>Sampled 73 days after green waste collected</i>	Villeurbanne, Rhône-Alpes, France	Forest residue

VII.3.2. Global analytical parameters

Global parameters, including TS, VS, COD, TOC, and SOC, were used to characterize the samples in a general manner with respect to overall groups of components or properties as listed in Table 2.

Organic matter content: Total solid (TS) and volatile solid (VS) were quantified according to standard methods [17, 18]. Total carbon content (TC) was determined using OI Analytical® – 1020A TOC analyzer following the standard procedure ISO 10694 [19] based on catalytic oxidation of the samples with oxygen at 950°C followed by infrared analysis of the CO₂ produced. Total organic carbon content TOC was measured in the same manner after the sample was acidified with 150 g L⁻¹ solution of ortho-phosphoric acid (H₃PO₄) in order to remove inorganic carbon. The chemical oxygen demand (COD) was measured by oxidizing the powdered samples with a solution of potassium dichromate and sulfuric acid for 2 hours at a temperature of 135°C. Dichromate ions were reduced to Cr³⁺ ions which were analyzed by spectrophotometry at 585 nm.

Water soluble organic fraction: To extract water soluble components from the biomass substrates, aqueous suspensions of 10 g of 1 mm powdered samples in 100 mL of deionized water were mixed for 3h at room temperature in a rotary tumbler set at 0.17 Hz, according to the European standard leaching procedure [20]. For each sample, the extraction step was triplicated. The leachates (aqueous extracts) were filtered through a 0.45 µm pore size membrane and the solutions subsequently analyzed for soluble organic carbon (SOC) and chemical oxygen demand (COD) following standard methods [21, 22].

VII.3.3. Organic matter characterization

a. Fiber content

The fiber contents were determined with the FiberCap® 2023 Manual System (FOSS®) according to the standard procedure ISO 13906 (2008) [23] developed from Van Soest's sequential extraction method [24]. The method consisted in a 3-stage protocol involving reagents of increasing hydrolytic power. The first step allowed the extraction of the soluble fraction (SOL) using a neutral detergent. The second step involved a dilute acid detergent meant to hydrolyze hemicelluloses (HEM). The last extraction with 720 g L⁻¹ sulfuric acid solution was meant to hydrolyze cellulose (CELL). The solid matter remaining after the 3 steps (residue, RES) was considered to correspond to lignin. It was collected, dried at 105°C, weighed and calcinated at 480°C for 4 h in a furnace (VS_{NDF}, VS_{ADF}, and VS_{ADL}). The results were calculated and expressed in grams of the considered constituent present in 1 kg of the total volatile solid material.

Table 2. Global analyses and organic leaching behaviour of substrates^a.

#	Designation	VS (g kg ⁻¹)	COD _{Tot} (g kg ⁻¹)	TOC (g kg ⁻¹)	COD _{Sol} (g kg ⁻¹)	% COD _{Sol} (%)	SOC (g kg ⁻¹)	% SOC (%)
S1	Corn stover	955 ± 3	1180 ± 5	45.6 ± 2.0	129.2 ± 2.7	10.5	52.1	10.9
S2	Corn bagasse	894 ± 6	1150 ± 80	46.3 ± 1.5	115.3 ± 0.6	9.0	47.7	9.05
S3	Barley Straw	949 ± 1	1220 ± 4	51.5 ± 2.4	76.2 ± 0.4	5.9	30.7	5.4
S4	Wheat Straw	915 ± 2	1250 ± 15	42.3 ± 1.1	81.5 ± 0.6	6.0	34.4	7.4
S5	Sugarcane bagasse #1	968 ± 2	1260 ± 15	50.0 ± 1.9	280.3 ± 0.9	21.5	71.5	12.8
S6	Sugarcane bagasse #2	938 ± 2	1240 ± 15	44.5 ± 2.4	15.1 ± 0.6	1.1	6.1	1.3
S7	Hazel branches	973 ± 3	1345 ± 20	46.6 ± 0.9	59.7 ± 0.3	4.3	23.2	4.8
S8	Pseudo-acacia branches	957 ± 1	1300 ± 50	45.2 ± 2.0	113.7 ± 0.4	8.4	47.0	9.9
S9	Mix Wood #1	627 ± 5	990 ± 9	39.5 ± 2.7	41.6 ± 0.3	4.2	15.3	1.9
S10	Mix Wood #2	780 ± 2	1080 ± 50	40.1 ± 0.8	21.9 ± 0.3	2.6	8.2	1.5
S11	Wood	983 ± 2	1370 ± 15	49.2 ± 2.5	28.2 ± 0.4	1.6	5.4	1.1
S12	Mix Green waste #1	618 ± 6	889 ± 19	41.1 ± 5.9	183.3 ± 4.0	12.7	70.5	10.6
S13	Mix Green waste #2	504 ± 9	756 ± 10	35.1 ± 1.1	110.5 ± 1.2	7.4	48.0	6.8
S14	Mix Green waste #3	781 ± 1	972 ± 17	42.8 ± 7.0	234.3 ± 4.2	18.8	86.5	15.8

a: Data reported as mean ± standard deviation from three replicate determinations.

b. Analysis of organic components

The powdered samples were firstly extracted using the Dionex ASE 350 system following NREL Laboratory Analytical Procedure NREL/TP-510-42619 [25]. The procedure involved a two-step extraction process to remove water soluble material (WAT) with HPLC grade water and ethanol soluble material (EthOH) with a volume fraction of 99.9% ethanol. The pressure and the temperature were set at 10.34 Mpa and 100°C, respectively. The samples thus treated were then used in the following steps to determine cellulose (Cellulose), hemicelluloses (Hemicelluloses) and lignin (Lignin) contents according to NREL Laboratory Analytical Procedure NREL/TP-510-42618 [26]. For each sample, an aliquote of 300 mg was treated at 30°C for 1h with 3 mL of 720 g L⁻¹ sulphuric acid aqueous solution. Then, the solution was diluted to a final sulphuric acid concentration of 40 g L⁻¹, and autoclaved at 121°C for 1h. The suspension was cooled and filtered at 0.45 µm. The acid insoluble residue was collected and dried at 105°C overnight, weighed and then calcinated at 575°C for 24 h in a furnace. The mass loss during calcination was considered to be acid-insoluble lignin. Acid-soluble lignin was estimated from the UV absorbance at 205nm of the acidic solution. Monomeric sugars (glucose, xylose, galactose, arabinose, and mannose) were analyzed with a Waters® HPLC system equipped with a Bio-Rad Aminex HPX-87P column operated at 85°C and a refractive index detector (RID) operated at 49°C, using HPLC grade water as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. Cellulose and hemicellulose contents in the substrates were calculated from the concentrations of their constitutive monomers produced by their acid hydrolysis.

VII.3.4. Biodegradation measurements

Biodegradability of the biomass substrates under aerobic and anaerobic conditions was determined experimentally from the powdered samples using batch manometric methods previously described [27, 28]. Results were treated to be expressed under standard temperature and pressure conditions (0°C and 10⁵ Pa). Blanks containing only liquid mineral medium and microbial seed suspension were incubated and monitored as the assays. Aerobic and anaerobic biodegradabilities were expressed with respect to the COD content in the solid samples.

a. Respirometry (Aerobic biodegradability; BOD)

The protocol was adapted to suspended solid samples from the classical Biochemical Oxygen Demand (BOD) protocol initially developed for liquid samples. The BOD flasks were hermetically closed by manometric caps to monitor pressure variations inside the bottles. Carbon dioxide produced from biodegradation was trapped by sodium hydroxide pellets placed in a specific compartment in the headspace of the test flasks. Consequently, the recorded pressure decreased proportionally to the

oxygen consumed and was subsequently converted into BOD values. The samples were incubated in the dark for 28 days at 30°C under continuous magnetic stirring. The mineral medium composition was described previously [29]. BOD₂₈ was then calculated from the recorded data of oxygen consumption after 28 days of incubation, and expressed in g of O₂ per kg of VS. Aerobic biodegradability was calculated as the ratio between the BOD₂₈ thereby measured and the COD_{Tot} analyzed in the solid samples according to Eqn. 1.

$$BD_{Aero} (\%) = \frac{BOD_{28} (gO_2 kgTS^{-1}) \times 100}{COD_{Tot} (gO_2 kgTS^{-1})} \quad (1)$$

b. Biomethane potential, BMP

Biomethane potentials (BMP) were determined following the method described by Angelidaki et al. [28]. The nutrient medium was prepared according to the standard procedure ISO 11734 [30]. Inoculation was provided by the addition of an anaerobic sludge on the basis of 2 g of inoculum volatile solids for each gram of substrate volatile solid. Substrates in the form of fine powders (1 mm) were suspended in 200 mL of nutrient medium and 100 mL of inoculum suspension in 500 mL serum bottles. To insure anaerobic conditions, bottles containing the sample and inoculum suspensions were flushed for 5 minutes with a gas mixture of 70% N₂ and 30% CO₂. The bottles were sealed with gas-tight rubber stoppers and plastic seals, and incubated for 60 days at 35 ± 2°C in the dark. Biogas production was monitored using a Digitron® 2085P pressure transducer. Gas composition was periodically analyzed with an Agilent® gas micro-chromatograph equipped with thermal conductivity detectors, a Poraplot U column for CO₂ and H₂S separation and a Molsieve column for O₂, N₂, and CH₄. BMP₆₀ was expressed in L of CH₄ per kg of VS under standard temperature and pressure conditions (0°C and 10⁵ Pa). The anaerobic biodegradability was expressed as the ratio between BMP production and COD_{Tot} of the biomass materials according to Eqn. 2:

$$BD_{Anas} (\% \text{ of } COD) = \frac{BMP_{60} (L kgTS^{-1}) \times 100}{0.35 \times COD_{Tot} (gO_2 kgTS^{-1})} \quad (2)$$

VII.3.5. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was carried out following the NREL procedure [31]. The samples were diluted to 15g L⁻¹ in a 12.9 g L⁻¹ sodium citrate buffer (pH 4.8). Cellulase (Sigma-Aldrich, 60 FPU mL⁻¹) and β-glucosidase (Sigma-Aldrich, 246 ρNPGU mL⁻¹) loadings were 60 FPU g⁻¹ cellulose and 64 ρNPGU g⁻¹ cellulose, respectively. Hydrolysis was conducted at 50°C in flasks placed in a shaking water bath at 150 rotations per minute. After 168 h, the reaction was terminated by introducing boiling water and maintaining ebullition for 5 min to deactivate the enzymes, and the supernatant from each sample was filtered through 0.22 μm filters. Soluble glucose concentration in the enzymatic hydrolysate was measured by HPLC Waters® using a Bio-Rad HPX-87H column and refractive index detector (RID)

that were maintained at 45°C and 30°C, respectively. A 0.49 g·L⁻¹ H₂SO₄ aqueous solution was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The digestibility of cellulose was determined as follows:

$$\text{Enzymatic cellulose degradation (ECD) (\% of Cellulose)} = \frac{\text{cellulose digested (g)}}{\text{cellulose added (g)}} \times 100 \quad (3)$$

VII.3.6. Statistical analysis of experimental data

Analytical data were firstly treated by principal component analysis (PCA) to identify the multiple correlations between the variables on the one hand, the substrates on the other. PCA is a multivariate statistical data reduction technique where the new variables (principal components or factors) are calculated from linear combinations of the original variables. The principal components are orthogonal to each other to avoid any redundant information. The first principal component, or factor, accounts for the greatest variability in the data. PCA calculations were carried out with Matlab[®] software.

Then, 2 by 2 correlations were studied between the results of anaerobic biodegradation BMP and specific variables or combination of variables, using linear regression evaluations.

VII.4. Results and discussion

VII.4.1. Analytical results and general correlation using PCA

Results of characterization of the 14 biomass substrates are reported in Tables 2 to 4. The whole set of analytical data obtained for 9 of the 14 substrates were treated by PCA (substrates denoted S1 to S9). The other 5 substrates, denoted S10 to S14, were excluded from PCA analysis because some of the data were missing for ECD and biochemical characterization with the NREL procedure (WAT, EthOH, Cellulose, Hemicellulose and Lignin). All data from S1 to S9 were normalized by taking the log₁₀, extracting the mean and dividing it by the standard deviation. The PCA of normalized data resulted in the expression of four major components representing respectively 41, 21, 17 and 11% of the overall variance of the initial data set. Considering the cumulative variance, the first 2 components PC1 and PC2 accounted for 62% of the overall variance. In order to expand the representativeness of the statistical analysis, the first 4 components were considered here, representing 90% of the overall variance.

The first principle component (horizontal axis in Fig. 1a) expressed 41% of the overall variance. This axis PC1 was associated to the parameters positioned close to both PC1 and the correlation circle in Fig. 1a. These parameters were the residual fraction (RES) from Van Soest sequential extractions and

Lignin content from the NREL acid hydrolysis, which were shown to be strongly correlated to each other and determinant of PC1 axis.

The position of these two parameters was opposite to cellulose and hemicelluloses contents determined either from Van Soest sequential extractions (CELL and HEM) or from the NREL acid hydrolysis (“cellulose” and “hemicellulose”), indicating that biomass substrates with high cellulose and/or hemicelluloses contents were generally poor in lignin, and conversely. Biodegradability parameters BMP_{60} and BOD_{28} were located close to each other but far away from the circle of correlation, indicating that the 2 parameters were correlated but not well represented by the axes PC1 and PC2. Parameters related to soluble organic matter (COD_{Sol} and SOC) were positioned closely and to a lesser extent also close to Van Soest fraction SOL which was determinant in the second principle component (PC2) as shown in Fig. 1a. No clear correlation of the other parameters was revealed with respect to PC1 and PC2, in particular between BMP and extractive fractions SOL, WAT, and EthOH, which was not in agreement with those reported elsewhere [13-15].

Table 3. . Bioreactivity analyses of substrates: enzymatic cellulose degradation (ECD), biological oxygen demand (BOD₂₈), and biochemical methane potential (PBM₆₀)^a.

#	Designation	ECD (g kg ⁻¹)	BOD ₂₈ (g kg ⁻¹)	BD _{Aero} (%)	BMP ₆₀ (L kg ⁻¹)	BD _{Ana} (%)
S1	Corn stover	358 ± 14	935 ± 9	75.9	306 ± 3	70.9
S2	Corn bagasse	256 ± 6	994 ± 2	77.5	353 ± 18	78.5
S3	Barley Straw	197 ± 13	829 ± 30	64.6	278 ± 2	61.8
S4	Wheat Straw	203 ± 2	952 ± 5	69.8	324 ± 15	67.8
S5	Sugarcane bagasse #1	117 ± 20	775 ± 24	59.4	252 ± 5	55.2
S6	Sugarcane bagasse #2	150 ± 4	660 ± 41	50.0	225 ± 22	48.6
S7	Hazel branches	88 ± 5	495 ± 25	35.9	97 ± 2	20.2
S8	Pseudo-acacia branches	228 ± 8	873 ± 8	64.5	151 ± 2	31.9
S9	Mix Wood #1	134 ± 22	690 ± 64	43.9	99 ± 6	18.0
S10	Mix Wood #2	ND	481 ± 29	34.8	70 ± 6	14.6
S11	Wood	ND	131 ± 12	9.4	16 ± 1	3.3
S12	Mix Green waste #1	ND	316 ± 10	21.9	64 ± 7	12.5
S13	Mix Green waste #2	ND	714 ± 45	47.6	137 ± 10	26.1
S14	Mix Green waste #3	ND	868 ± 8	69.8	177 ± 16	40.6

ND : *not determined* : Data reported as mean ± standard deviation from three replicate determinations.

Table 4. Biochemical analyses of substrates^a.

#	Designation	Van Soest fiber extraction				NREL carbohydrates extraction				
		SOL (g kg ⁻¹)	HEM (g kg ⁻¹)	CELL ^c (g kg ⁻¹)	RES (g kg ⁻¹)	WAT (g kg ⁻¹)	EThOH (g kg ⁻¹)	Hemicellulose (g kg ⁻¹)	Cellulose ^d (g kg ⁻¹)	Lignin (g kg ⁻¹)
S1	Corn stover	146 ± 15 ^b	176 ± 12 ^b	562 ± 21 ^b	116 ± 5 ^b	15 ± 6	14 ± 1	376 ± 9	354 ± 7	115 ± 1
S2	Corn bagasse	55 ± 21	400 ± 28	490 ± 9	54 ± 2	84 ± 3	39 ± 6	245 ± 4	378 ± 8	122 ± 6
S3	Barley Straw	122 ± 3	316 ± 5	501 ± 25	61 ± 23	85 ± 1	28 ± 4	302 ± 13	373 ± 1	138 ± 9
S4	Wheat Straw	133 ± 9	282 ± 11	509 ± 5	76 ± 4	76 ± 2	30 ± 2	230 ± 2	382 ± 4	143 ± 24
S5	Sugarcane bagasse #1	218 ± 3	231 ± 10	441 ± 44	110 ± 30	245 ± 5	27 ± 4	189 ± 2	307 ± 1	158 ± 2
S6	Sugarcane bagasse #2	52 ± 9	367 ± 7	517 ± 04	64 ± 1	10 ± 1	14 ± 2	270 ± 4	413 ± 09	162 ± 22
S7	Hazel branches	106 ± 8	154 ± 9	553 ± 05	187 ± 4	50 ± 2	30 ± 1	164 ± 14	316 ± 2	204 ± 4
S8	Pseudo-acacia branches	182 ± 8	176 ± 13	481 ± 10	161 ± 3	81 ± 7	40 ± 4	121 ± 3	344 ± 4	160 ± 5
S9	Mix Wood #1	137 ± 27	149 ± 40	450 ± 23	263 ± 9	45 ± 3	37 ± 2	163 ± 13	243 ± 24	295 ± 8
S10	Mix Wood #2	121 ± 1	138 ± 15	468 ± 23	280 ± 8	ND	ND	ND	ND	ND
S11	Wood	50 ± 2	150 ± 3	500 ± 8	300 ± 10	ND	ND	ND	ND	ND
S12	Mix Green waste #1	318 ± 3	52 ± 24	384 ± 42	245 ± 6	ND	ND	ND	ND	ND
S13	Mix Green waste #2	368 ± 5	158 ± 10	184 ± 11	290 ± 18	ND	ND	ND	ND	ND
S14	Mix Green waste #3	429 ± 8	145 ± 8	290 ± 12	136 ± 15	ND	ND	ND	ND	ND

ND : not determined

a : Data reported as mean ± standard deviation from three replicate determinations.

b : [38]

c : CELL : cellulose content determined by the Van Soest fiber extraction

d : Cellulose : cellulose content determined by the NREL carbohydrate extraction

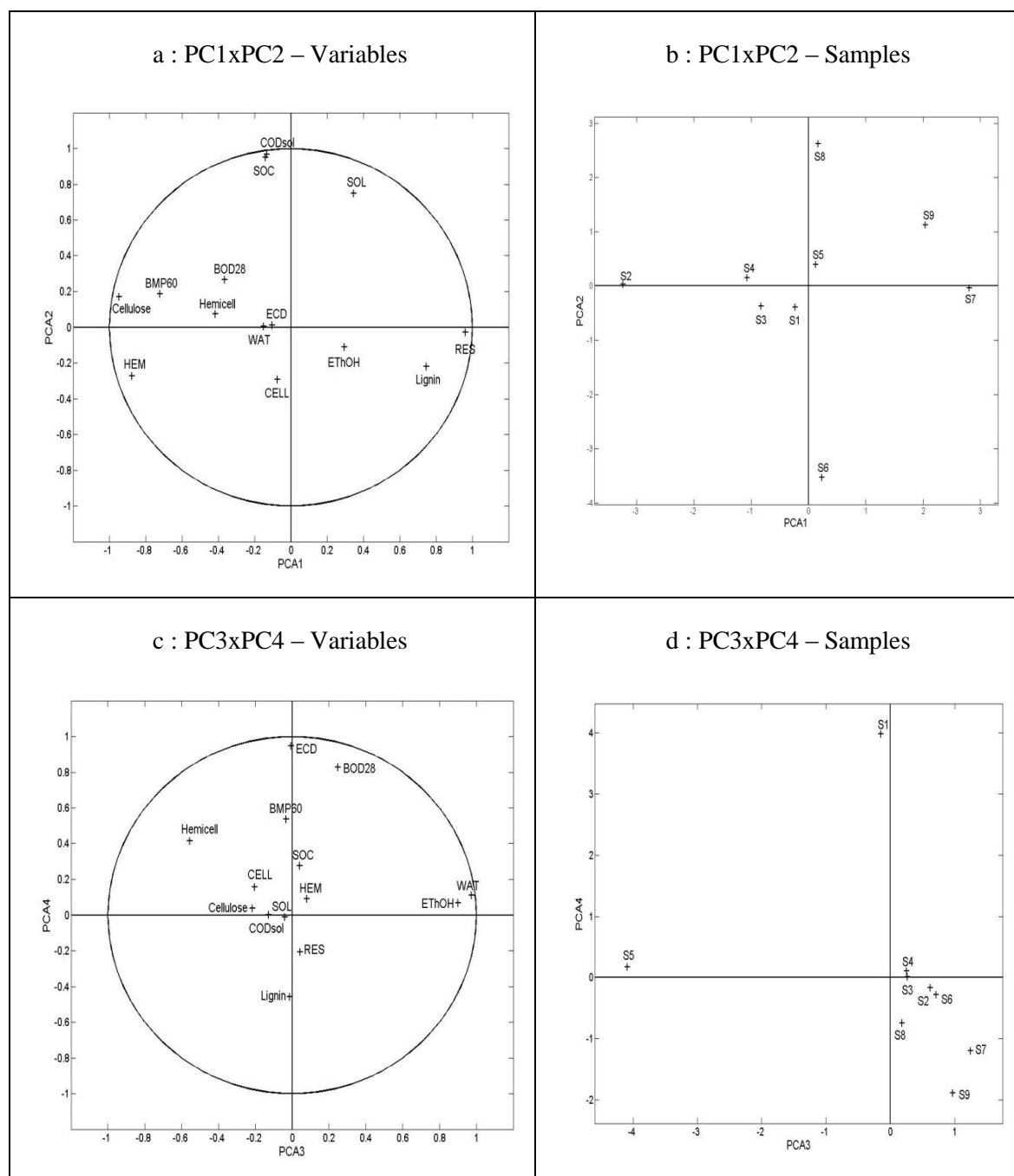


Figure 1: Plot of the loadings of the variables (a and c) and samples scores (b and d) with principal components PC1xPC2, and PC3xPC4.

Regarding the following two principle components PC3 and PC4, Fig. 1b showed that WAT and EthOH (respectively water and ethanol soluble fractions according to NREL protocol) overlapped and were determinant in axis PC3. PC4 was determined by the hydrolytic parameter ECD and biodegradability parameter BOD₂₈, and to a lesser extent to BMP₆₀ which was positioned on axis 4 but at a distance from the circle of correlation.

Fig. 1 showed the distribution of substrates S1 to S9 in PC1 / PC2 and PC3 / PC4 representations respectively. Most of the substrates were distributed along PC1 (Fig. 1a). The most biodegradable substrate (S2) “Corn bagasse” was positioned on the left hand side of the axis, while the most recalcitrant one (S7) “Hazel branches” was on the right hand side of PC1 which was determined by high RES and high lignin contents as discussed above. Substrates S8 “Acacia branches” and S6 “Sugarcane bagasse #2”) however were associated with PC2 and not PC1. This observation can be explained by their high COD_{sol} (S8) or low SOC contents (S6) since these 2 variables are determinant for PC2.

PC3 / PC4 representation (Fig. 1b) was poorly discriminant for most substrates which were positioned relatively close to each other near the center of the graph. Substrate S5 however (“Sugarcane bagasse #1”) appeared isolated on the left side of PC4. This discriminant position of S5 (bagasse) was due to its particularly high content in water-soluble (WAT) and ethanol-soluble (EthOH) fractions which were the determinant variables of PC4. Bagasse is the solid residue from the process of sugar extraction from sugarcane pressing. Although high extraction yields are sought industrially, the conditions of extraction in Haiti are such that the yield is limited. Bagasse therefore still contains significant residual amounts of soluble sugars.

VII.4.2. Correlation between biochemical methane potential (BMP) and other variables

Multi-variable correlation analysis using PCA revealed that BMP was controlled primarily by the lignin or residual (RES) contents of the substrates. In order to describe more precisely the incidence of biochemical characteristics on biodegradability (more specifically on the potential production of methane by anaerobic digestion), the correlations between BMP and some variables or combination of variables were studied.

a. Comparison of the methods and results of biochemical analyses

Results of biochemical analyses are given in Table 4. It can be seen that, regardless of the analytical method used (Van Soest or NREL methods), cellulose contents were higher in the agricultural crops residues (S1 to S6) than in the forest residues (S7 to S9). On the opposite, lignin contents determined with either analytical method were found to be lower in the agricultural residues than the forest residues. These observations were in agreement with the relatively higher biodegradability of agricultural residues as compared to forest residues.

Analytical results also showed that cellulose and hemicelluloses were the predominant biopolymers in all the substrates analysed, regardless of the analytical method used.

Table 4 also showed however that Van Soest fractionation method and NREL acid hydrolysis method provided different results of biochemical compositions in many of the substrates analysed. The observed differences on each parameter might be attributed to the nature of the solvents or reagents used. For example, cellulose content measured by Van Soest method was higher than that measured by NREL method. It was concluded that some structural compounds other than cellulose were extracted along with cellulose into the “CELL” fraction in Van Soest method, as suggested by other authors [32].

Moreover, SOL content (Van Soest method) was found to exceed the sum of fractions WAT and EthOH (NREL method), except for corn bagasse (S2). It was concluded that the neutral detergent solution used in Van Soest method was more aggressive than water and ethanol with respect to the extraction of soluble materials. An opposite observation was done with lignin however, since Van Soest’s fraction RES was found to be lower than the Lignin content measured with NREL method. This result might be attributed to the partial degradation of hemicelluloses during the autoclaving step in NREL method, and the resulting possible formation of acidic insoluble pseudo-lignin as already reported by other authors [33]. In addition, other components, including proteins and suberins, may also precipitated during autoclaving and therefore be analyzed wrongly as lignin [34]. The results of this study therefore did not reveal significant trends that may allow to recommend one method rather than the other to determine biochemical characteristics. Further study involving a largest set of data would be necessary to better determine how the origin and characteristics (structural and compositional) of the substrates would affect the results given by each method.

b. Correlation between BMP and ratios of specific variables of biochemical composition

The correlations between the results of BMP measured on the 14 substrates and the ratios of some selected variables of their biochemical composition was studied by linear regressions. The ratios of variables considered here and the corresponding square of the correlation coefficient (R^2) are shown in Figure 2.

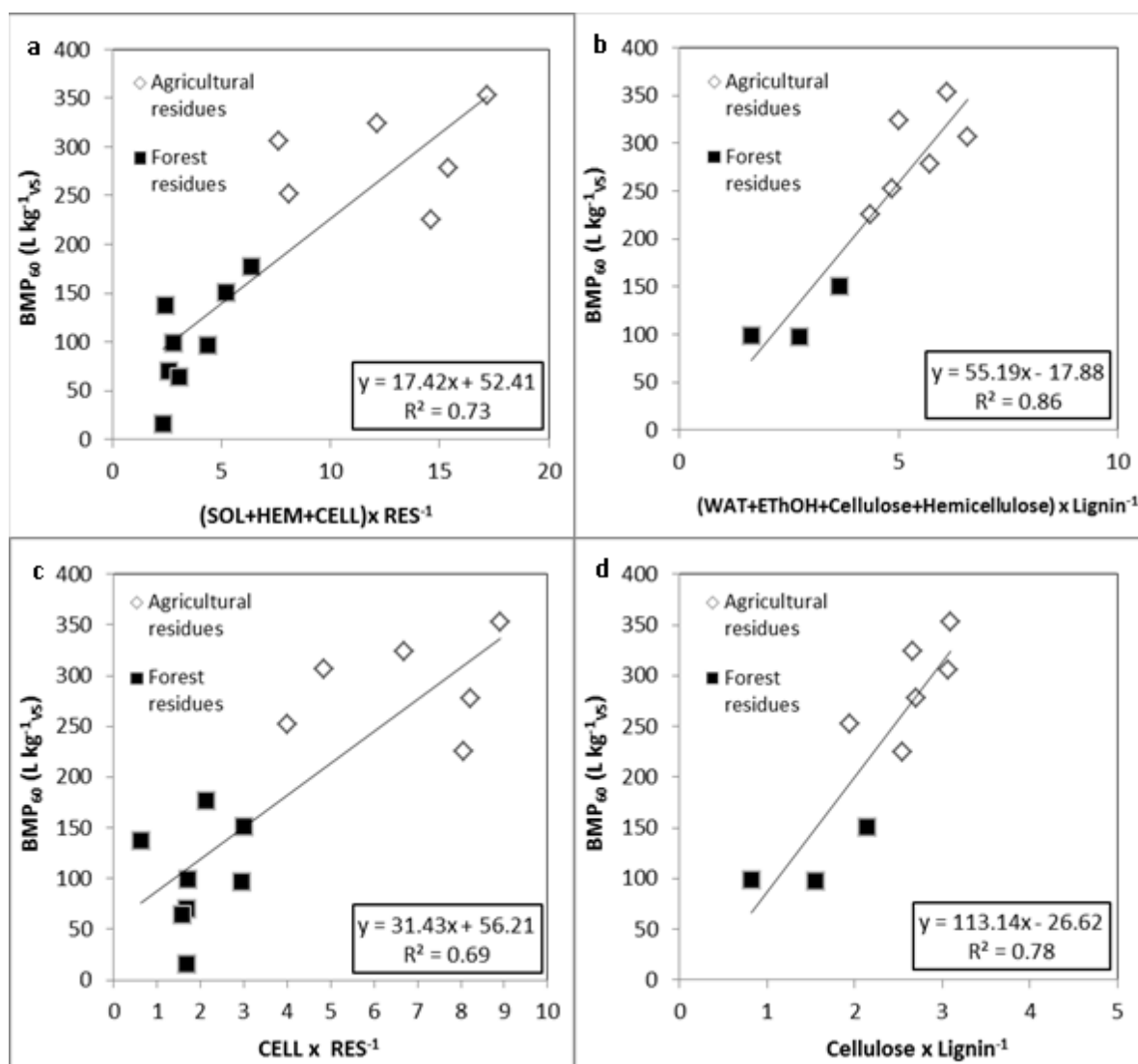


Figure 2: Relationship between BMP_{60} and ratio of biochemical composition. CELL: cellulose content determined by the Van Soest fiber extraction; Cellulose: cellulose content determined by the NREL carbohydrate extraction.

Relatively good linear correlations R^2 were obtained with the following ratios of variables:

$(WAT+EthOH+Cellulose+Hemicellulose) \times Lignin^{-1}$ ($R^2=0.86$);

$Cellulose \times Lignin^{-1}$ ($R^2=0.78$);

$(SOL+HEM+CELL) \times RES^{-1}$ ($R^2=0.73$);

$CELL \times RES^{-1}$ ($R^2=0.69$).

The best correlation (R^2 of 0.86) was obtained with $(WAT+EthOH+Cellulose+Hemicellulose) \times Lignin^{-1}$. The methane potentials (BMP) of the 14 substrates analyzed were therefore well correlated with the ratio between the sum of non-lignin fractions over the lignin content. However, the

correlation between BMP and Cellulose x Lignin⁻¹ ratio offered the best compromise between the quality of the regression (R^2 of 0.78) and the simplicity of the ratio (only 2 variables used).

Following a similar approach on other types of biomass substrates (fruits and vegetable solid wastes), Gunaseelan (2007) proposed a regression model to express BMP as a function of soluble carbohydrate contents (ADF), lignin to ADF ratio, nitrogen and ash contents [10].

c. Correlation between BMP and non-extractable fractions

Non-extractable fractions were here considered to be the RES and lignin fractions in Van Soest and NREL methods respectively. As discussed above, PCA showed that BMP values were well correlated with lignin contents both in the agricultural and forest residues analyzed here. Figs. 3a and b confirmed the correlation shown by PCA since the coefficient of linear regression R^2 were at least 0.76. They also showed that the correlation with lignin content was better than with the RES content in agricultural residues S1 to S6. The comparison was not possible with the forest residues because the set of data was not complete in this group of substrates. However, it should be noted that S9 (Mix Wood #1) in Fig. 3b was far away from the linear trend, which might be attributed to the low VS content in this substrate composed of a mix of forest residues. These results confirmed previously published articles which reported that lignin content was the most relevant parameter to evaluate BMP of lignocellulosic biomass [1, 10, 12-15]. It was concluded that RES and lignin fractions were not converted into methane and increased the recalcitrance of the substrates.

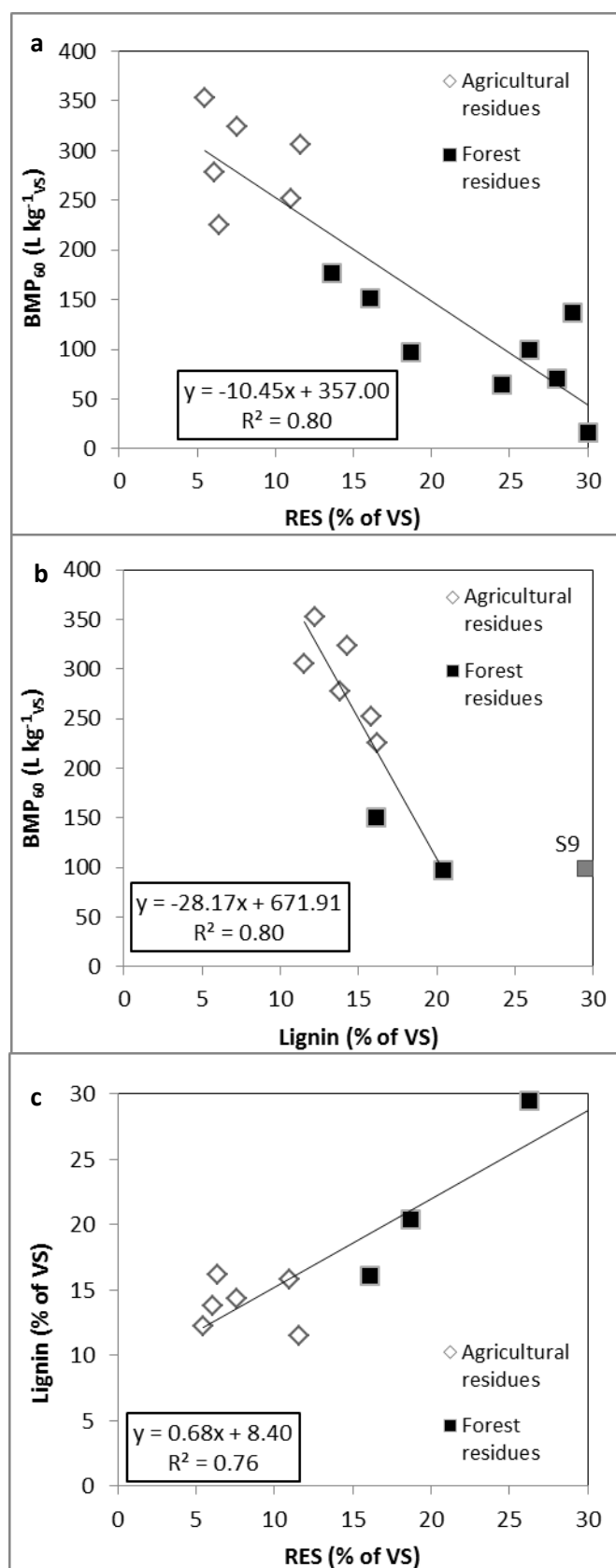


Figure 3: Relationship between BMP₆₀ and RES or Lignin content: BMP₆₀ and RES (a); BMP₆₀ and Lignin (b); RES and Lignin (c).

d. Correlation between BMP and other characteristics of bioreactivity: BOD₂₈ and ECD

Fig. 4a showed that BMP was linearly correlated with BOD₂₈ for the 14 substrates analyzed. However, crops (S1 to S6) and forest (S7 to S14) residues exhibited different patterns of correlation (Fig. 5), which may be attributed to the differences in lignin contents in the 2 groups of substrates (Table 4), and also probably to the differences in the structure of the lignocellulosic complex as suggested by other authors [36, 37].

The highest biodegradability under aerobic conditions was observed with the agricultural residues, which revealed nearly identical biodegradability under anaerobic condition. Forest residues however, which were characterized by higher lignin and residual (RES) contents, were found to be almost twice as much biodegradable under aerobic as compared to anaerobic conditions. This very different pattern of behavior between the 2 groups of samples may be explained by their specific compositional characteristics, but structural parameters were probably determinant [13].

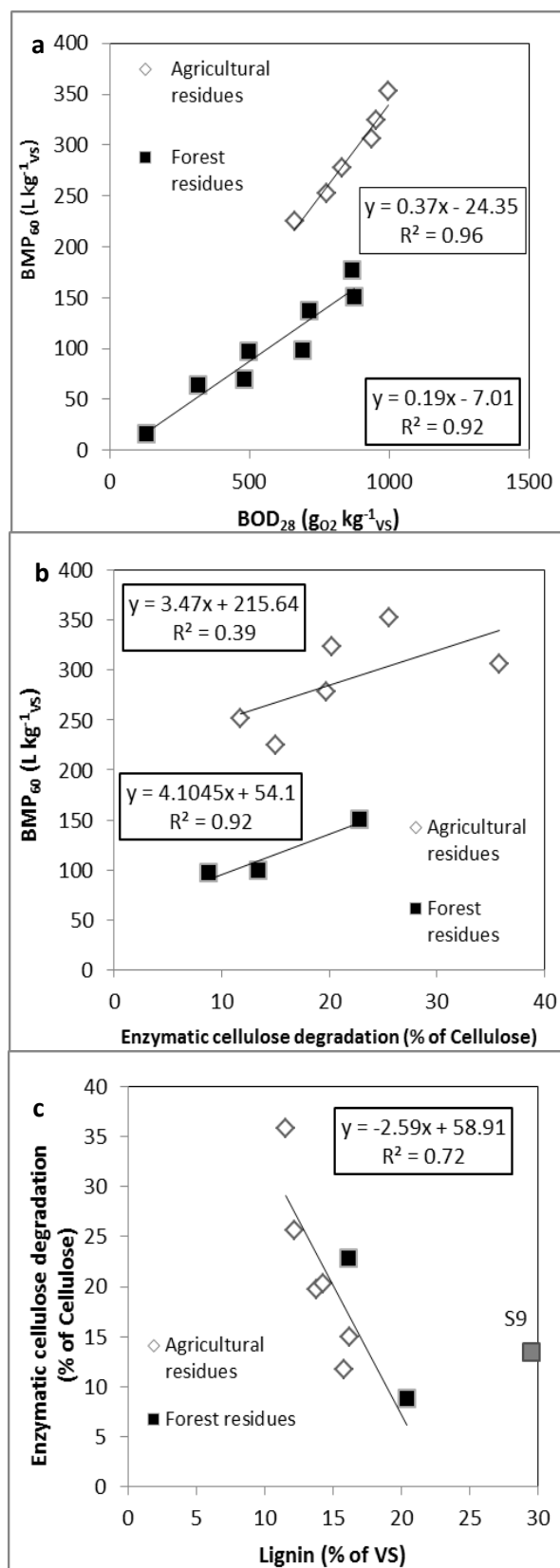


Figure 4: Relationship between BMP₆₀ and BOD₂₈ (a); BMP₆₀ and Enzymatic cellulose degradation (ECD) (b); ECD and Lignin (c).

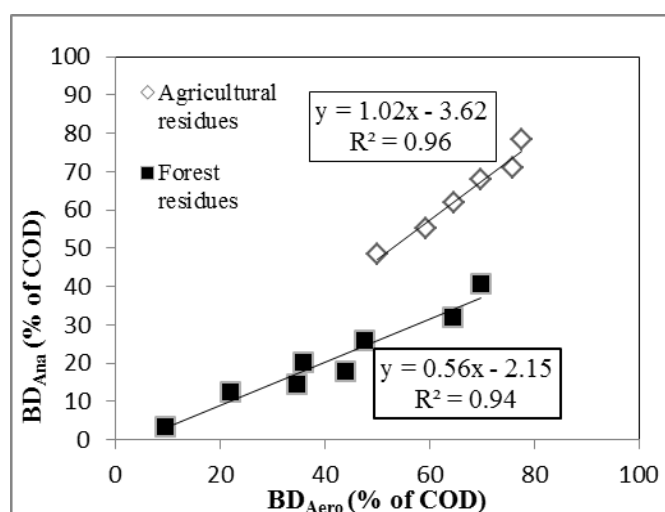


Figure 5: Relationship between anaerobic biodegradation BD_{Ana} and BD_{Aero} .

The correlation between BMP and ECD was not very good for agricultural residues (Fig. 4b). The comparison was not possible with the forest residues because the set of data was not complete. The correlation between BMP and ECD obtained here was different from that reported by Liew *et al.* [14] who observed a strong linear relationship on four lignocellulosic substrates. This might be due to differences in BMP or ECD protocols or in the nature of the substrates used. It seems likely that different types of lignocellulosic substrates would exhibit different relationships between BMP and ECD. Fig. 4c showed that ECD of both agricultural and forest residues decreased as the content of lignin increased (except for S9 which had a low VS content) which was in agreement with the results reported by Masarin *et al* [35]. Although the present results confirmed that lignin content is the most influent parameter to control cellulose accessibility to enzymes and microorganisms, compositional parameters do not appear sufficient to estimate biodegradability the general case.

VII.5. Conclusions

The search for linear correlations between the methane potentials (BMP) and specific variables or combinations of variables in the 14 substrates selected in this study revealed a very good correlation with the ratio between the sum of non-lignin fractions over the lignin content. However, the correlation with Cellulose x Lignin⁻¹ ratio offered the best compromise between the quality of the regression and the simplicity of the ratio (only 2 variables used).

Agricultural residues and forest residues revealed different behaviors regarding aerobic and anaerobic digestibility. Two significant linear relationships were observed between BMP_{60} and BOD_{28} in the 2 groups of substrates, but a single, relatively strong pattern of linear correlation was found between ECD and the lignin content. Although results showed that BMP_{60} and other characteristics of

lignocellulosic substrates were interrelated, the analytical parameters considered here did not provide enough information to be used to predict BMP₆₀. Further researches are therefore necessary on a larger set of biomass substrates with complementary analytical parameters including structural properties of the biopolymers and the lignocellulosic complex.

VII.6. References

- [1] Triolo JM, Pedersen L, Qu H, Sommer SG. Biochemical methane potential and anaerobic biodegradability of non-herbaceous and herbaceous phytomass in biogas production. *Bioresource Technology* 2012 Dec;125: 226–2.
- [2] Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew Sust Energ Rev* 2012 Apr;16:1462-76.
- [3] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept: a review. *Prog. Energy Combust. Sci.* 2012 Aug;38:522–50.
- [4] Frigon JC, Guiot SR. Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2010 Apr;4:447-58.
- [5] Chandler JA, Jewell WJ, Gossett JM, Van Soest PJ, Robertson JB. Predicting methane fermentation biodegradability. Symposium on biotechnology in energy production and conservation, Gatlinburg, TN, USA, 3 Oct 1979 (16th edn.). *Biotechnology & Bioengineering* 1980 Jan;10:93–107.
- [6] Noike T., Endo G., Chang J.E., Yaguchi J.I., Matsumoto, J.I. Characteristics of carbohydrate degradation and the rate limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnology & Bioengineering* 1985 Jan;27:1482-85.
- [7] Tong X, Smith LH, McCarty PL. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass* 1990 Apr;21:239-55.
- [8] Eleazer WE, Odle WS, Wang YS, Barlaz MA. Biodegradability of municipal solid waste components in laboratory-scale landfills, *Environmental Science and Technology* 1997 Feb;31:911-7.
- [9] Buffière P, Loisel D, Bernet N, Delgenes JP. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Sci. Technol.* 2006 Aug;53:233-41.
- [10] Gunaseelan VN. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition. *Bioresour. Technol.* 2007 Apr; 98:1270–77.

- [11] Gunaseelan VN. Predicting ultimate methane yields of *Jatropha curcus* and *Morus indica* from their chemical composition. *Bioresour. Technol.* 2009 July;100,3426–29.
- [12] Triolo JM, Sommer SG, Moller HB, Weisbjerg MR., Jiang XY. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: Influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresour. Technol.* 2011 July;102,9395–402.
- [13] Monlau F, Sambusiti C, Barakat A, Guo XM, Latrille E, Trably E, Steyer JP, Carrere H. Predictive models of biohydrogen and biomethane production based on the compositional and structural features of lignocellulosic materials. *Environ Sci Technol.* 2012 Oct;46:12217-25.
- [14] Liew LN, Shi J, Li Y. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass Bioenerg* 2012 Nov;46:125-32.
- [15] Xu F, Wang ZW., Li Y. Predicting the methane yield of lignocellulosic biomass in mesophilic solid-state anaerobic digestion based on feedstock characteristics and process parameters. *Bioresour. Technol.* 2014 Dec;173:168-76.
- [16] Jeffries TW. Biodegradation of Lignin and Hemicelluloses. In: Ratledge C. (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994. p. 233–77.
- [17] AFNOR NF U 44-160. Amendements organiques et supports de culture - Détermination de la matière organique totale - Méthode par oxydation. La Plaine Saint-Denis (Fr), 1985.
- [18] ISO 11465. Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis - Gravimetric method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1993. (available at www.iso.ch).
- [19] ISO 10694. Soil quality — Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1995. (available at www.iso.ch)
- [20] AFNOR NF EN 12457-2. Caractérisation des déchets - Lixiviation - Essai de conformité pour lixiviation des déchets fragmentés et des boues - Partie 2 : essai en bâchée unique avec un rapport liquide-solide de 10 l/kg et une granularité inférieure à 4 mm (sans ou avec réduction de la granularité). La Plaine Saint-Denis (Fr), 2002.
- [21] ISO 15705. Water quality -- Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD) -- Small-scale sealed-tube method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2002. (available at www.iso.ch)
- [22] ISO 8245. Water quality -- Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1999. (available at www.iso.ch)

- [23] ISO 13906. Animal Feeding Stuffs: Determination of Acid Detergent Fibre (ADF) and Acid Detergent Lignin (ADL) Contents. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2008. (available at www.iso.ch)
- [24] Van Soest PJ, Wine RH. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. J. Assn. Offic. Anal. Chem. 1967 Jan;50:50-5.
- [25] Sluiter A., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter, J., Templeton D., Wolfe, J. Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical Procedures (LAP). Golden (CO): National Renewable Energy Laboratory; 2008 Jan. 9 p. Report. No.: NREL/ TP-510-42619. Sponsored by the Department of Energy. Contract No.: DE-AC36-99-GO10337.
- [26] Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedures (LAP). Golden (CO): National Renewable Energy Laboratory; 2011 July. 15 p. Report. No.: NREL/ TP-510-42618. Sponsored by the Department of Energy. Contract No.: DE-AC36-08-GO28308.
- [27] Massardier-Nageotte V, Pestre C, Cruard-Pradet T, Bayard R. Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physico-chemical characterization. Polym Degrad Stab 2006 Mar;91:620-7.
- [28] Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D, Borzacconi L, Campos J, Guwy A, et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. Water Sci Technol 2009 May;59(5):927-34.
- [29] ISO 10707. Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1994.
- [30] ISO 11734. Water quality - Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge - Method by measurement of the biogas production. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1995.
- [31] Selig M, Weiss N, Ji Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Laboratory Analytical Procedures (LAP). Golden (CO): National Renewable Energy Laboratory; 2008 Mar. 8 p. Report. No.: NREL/ TP-510-42629. Sponsored by the Department of Energy. Contract No.: DE-AC36-99-GO10337.
- [32] Godin B, Agneessens R, Gerin PA, Delcarte J. Composition of structural carbohydrates in biomass: Precision of a liquid chromatography method using a neutral detergent extraction and a charged aerosol detector. Talanta 2011 Sept;55:2014-26.

- [33] Bauer A, Lizasoain J, Theuretzbacher F, Agger JW, Rincón M, Menardo S, et al. Steam explosion pretreatment for enhancing biogas production of late harvested hay. *Bioresour Technol* 2014 Aug;166:403-10.
- [34] Kirk TK, Obst JR. Lignin determination. In: Willis A. Wood STK, editor. *Methods Enzymol*: Academic Press; 1988. p. 87-101.
- [35] Masarin F, Gulpilhares DB, Baffa DC, Barbosa MH, Carvalho W, Ferraz A, et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol Biofuels* 2011 Jan;4:55-64.
- [36] Lapierre C, Pollet B, Rolando C. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res Chem Intermed* 1995 Mar;21:397-412.
- [37] Shen D, Liu G, Zhao J, Xue J, Guan S, Xiao R. Thermo-chemical conversion of lignin to aromatic compounds: Effect of lignin source and reaction temperature. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2015 Mar;112:56-65.
- [38] Medic D, Darr M, Shah A, Rahn S. The effects of particle size, different corn stover components, and gas residence time on torrefaction of corn stover. *Energies*. 2012 Apr;5:1199-214.

VIII. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomasses pretreated by *Ceriporiopsis subvermispora*

LIU Xun[°], HILIGSMAN Serge[#], GOURDON Rémy[°], BAYARD Rémy^{°*}

[°]Université de Lyon, INSA-Lyon, Laboratoire LGCIE-DEEP, Bât. S. Carnot, 9 rue de la Physique, F-69621 VILLEURBANNE, France.

[#] Walloon Centre of Industrial Biology (CWBI), Bd du Rectorat, 29, B.40 – P.70 B-4000 Liège, BELGIUM

* Corresponding author. Tel.: +33 472 438 753; fax: +33 472 438 717.

E-mail address: remy.bayard@insa-lyon.fr

Article soumis au Journal Bioresource Technology en novembre 2015

VIII.1. Abstract

The effects of fungal pretreatment of five lignocellulosic biomasses (Hazel, Acacia, Barley straw, Wheat straw and Sugarcane bagasse) with two particle sizes by *Ceriporiopsis subvermispora* on anaerobic digestion were investigated. Five biomasses were inoculated with two strains of *C. subvermispora* (ATCC 90467 and ATCC 96608) and incubated under solid state conditions at 28°C for 28 d to determine changes before and after fungal pretreatment in chemical composition, methane production and enzymatic cellulose digestibility. Lignolytic enzymes MnP and laccase were detected. Fungal pretreatment could significantly improve anaerobic digestion of Hazel and Bagasse compared to the three other biomasses. The methane yield of 1 mm Hazel pretreated with ATCC 90467 or 96608 increased by 52.8% or 97.5% compared to that of control sample, respectively. Kinetic constants of BMP of Bagasse pretreated by two strains were both 1.8 fold higher compared to that of untreated sample.

Keyword: *Ceriporiopsis subvermispora*; white-rot fungi; lignocellulosic biomass; biomethane potential; enzymatic hydrolysis.

Highlights:

- Fungal pretreatment with *C. subvermispora* could significantly improve anaerobic digestion of Hazel and Bagasse among five lignocellulosic biomasses.
- Two strains of *C. subvermispora* showed different metabolisms even on the same lignocellulosic biomass.
- The secretion of MnP and laccase depend on both the type and particle size of lignocellulosic biomass.
- The trends of enzymatic cellulose digestibility curves related to Hazel and Acacia samples are in accordance with those of BMP whatever the particle size.

VIII.2. Introduction

Lignocellulosic biomass has been considered as one of the most potential renewable energy resource in the world, as this is the most abundant organic resource (Bertrand et al., 2014; Gielen et al., 2001). Using lignocellulosic biomass does not enter into competition with food unlike energy crops such as sugar beet or maize. This also reduces concerns about land-use, since a large proportion of feedstock comes from agricultural and forestry residues (Bertrand et al., 2014; Monlau et al., 2015). Converting lignocelluloses to biofuels such as ethanol, biogas, and biodiesel as an alternative to fossil fuels is nowadays getting more and more attention. Production of methane-containing biogas from lignocellulosic residues by anaerobic digestion (AD) of agricultural and forestry activities is a promising way for biomass valorization in terms of economic and environmental benefits (Chandra et al., 2012). For these reasons, production of methane of lignocellulosic biomass, in general, agricultural waste or forestry residues, has become the focus of recent research.

Lignocellulosic biomass is mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose is a polymer of repeating β -D-glucopyranose units and is a key constituent of the lignocellulosic biomass (Dwivedi et al., 2009). Hemicelluloses are heterogeneous polymers of pentoses (xylose, arabinose), hexoses (mannose, glucose, galactose), and sugar acids (Saha, 2003). Lignin is a heterogeneous polymer that provides strength and rigidity to biomass and protects cellulose and hemicellulose from microbial attack (Floudas et al., 2012). The bioconversion of lignocellulose to biogas is a complex process, since lignocelluloses have a recalcitrant structure (Teghammar et al., 2014). Lignocellulose forms a compact structure organized as microfibrils in which the highly crystalline cellulose is well protected by a matrix of lignin and hemicellulose preventing the degradation of native cellulose (Goshadrou et al., 2013; Teghammar et al., 2014). In order to produce efficiently methane, pretreatment operations are necessary to break down the complex structure, make the polysaccharides

(cellulose and hemicellulose) more accessible to enzymes, and increase their bioconversion to methane.

A number of different pretreatment methods, such as physical, chemical and biological pretreatments have been recently evaluated (Zheng et al., 2014). Among others, biological pretreatment has attracted much more attention due to mild operating conditions, low cost and environmental-friendly feature. Fungal pretreatment with selective white-rot fungi is one of the most promising technology of pretreatment. These fungi produce ligninolytic enzymes i.e. mainly lignin peroxidase (LiP), laccase or manganese-peroxidase (MnP) that break down the network of lignin liberating cellulose et hemicellulose without intensive weight loss (Amirta et al., 2006; Guerra et al., 2003; Tanaka et al., 2009).

Among the various selective white-rot fungi studied (Akin et al., 1996; Amirta et al., 2006; Tian et al., 2012; Tuyen et al., 2012), *Ceriporiopsis subvermispora*, has shown high lignin-degrading selectivity by removing lignin without affecting cellulose (Akin et al., 1996; Fernandez-Fueyo et al., 2012; Itoh et al., 2003). *C. subvermispora* selectively degraded lignin by as much as 39.2% while the cellulose loss was less than 5% during 42 d of cultivation on Corn stover (Wan & Li, 2010a). After 28 d of fungal pretreatment with *C. subvermispora* on sugarcane bagasse, 18.2% of lignin loss and 2.1% of α -cellulose were observed (Sasaki et al., 2011). Wheat straw pretreated with *C. subvermispora* after 49 d of fermentation had the lowest ADL (acid detergent lignin) content but the highest cellulose content compared to 10 other white-rot fungi (Tuyen et al., 2012). However, to our knowledge no study has been reported on pretreatment of Hazel branches, Acacia branches and Barley straw.

Differences exist among the strains of *C. subvermispora* in terms of the effect of pretreatment of lignocellulosic biomass. Methane yield of Japanese cedar wood pretreated with *C. subvermispora* ATCC 90467 for 28 d reached 35% and 25% of the theoretical yield based on the holocellulose contents of the decayed and original wood, respectively (Amirta et al., 2006). Sugar yield by enzymatic saccharification of Japanese cedar pretreated with *C. subvermispora* ATCC 90467 and *C. subvermispora* ATCC 96608 for 28 d increased to 21.2% and 34.4%, respectively (Baba et al., 2011).

Moreover, particle size of lignocellulosic biomass is a major factor affecting the performance of fungal pretreatment (Wan & Li, 2012). Different particle sizes of biomass have been studied. For instance, fungal pretreatment of 5, 10, and 15 mm corn stover have been evaluated (Wan & Li, 2010b), 2 cm switchgrass pretreated with 25 diverse fungal strains were carried out (Liu et al., 2015), 2-3 cm wheat straw was pretreated with *C. subvermispora* to improve the nutritive value (Tuyen et al., 2012), *Eucalyptus grandis* wood chips measuring approximately 2.5 cm×1.5 cm×0.2 cm were pretreated with *C. subvermispora* to investigate alternation of chemical composition and lignolytic enzymes activities (Vicentim & Ferraz, 2007). However, relatively small particle size (inferior to 5 mm) of biomass pretreated with white-rot fungi was little studied.

The objective of the present study was to investigate the effects of fungal pretreatment of five lignocellulosic biomasses (Hazel and Acacia branches, Barley and Wheat straw and Sugarcane bagasse) with two particle sizes by two strains of *Ceriporiopsis subvermispora* on methane production. In the present study, the changes in the weight and components of pretreated biomass were characterized in order to study the effects of removing lignin by fungal pretreatment. Enzymatic hydrolysis of the biomass before and after fungal pretreatment was examined to evaluate the changes of enzymatic accessibility of biomass. In addition, ligninolytic enzymes activities (laccase and MnP) were measured. To study the effect of particle size on fungal pretreatment, two particle sizes of 1 and 4 mm were considered except for Sugarcane Bagasse (only 1 mm size).

VIII.3. Materials and Methods

VIII.3.1. Raw materials

Samples from two forest residues of Hazel and Acacia branches were collected from private forest of Régný - Rhône-Alpes in France. Samples from three agricultural residues of Barley straw, Wheat straw and Sugarcane Bagasse were also collected. Barley straw and Wheat straw were obtained from private farm located in the region of Picardie, France, and sugarcane bagasse was obtained from Artisanal distillery in Plaine de Cul-de-Sac, Port-au-Prince, Haiti. The samples of about 10 kg were homogenized and dried in an oven at 60°C for 3 d. They were shredded three times with a low-speed shredder (Blik® monorotor M420, Milly-la-Forêt, France) and sieved at 10 mm to obtain homogenous solid samples. The 1mm and 4 mm samples were achieved through fine shredding in a cutting mill (Retsch® SM 200, Haan, Germany). Samples were stored at 2°C before analysis or experiments carried out in triplicates.

VIII.3.2. Fungus and inoculum preparation

Ceriporiopsis subvermispora (ATCC 90467 named F1) and *Ceriporiopsis subvermispora* (ATCC 96608 named F2) cultures were stored on 33.6 g L⁻¹ malt extract agar plates at 4°C. The two strains were cultured on 33.6 g L⁻¹ malt extract agar at 28°C for 7 d. Ten discs (10 mm in diameter) of the agar plug of each strain were transferred to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 50 ml of 33.6 g L⁻¹ malt-extract medium and incubated unshaken at 28°C for 7 d. Each liquid culture was aseptically blended in three cycles of 15 s and then each mycelium suspension was used for inoculation (Wan & Li, 2010a).

The pretreatment of biomass by solid-state fermentation were carried out in 250 mL Erlenmeyer flask containing 10 g samples and 30 mL distilled water. Samples mixed in water were firstly autoclaved at 121°C for 30 min, and then were loaded with F1 or F2 liquid culture after being cooled to room temperature. 2 ml liquid culture was added in the flasks. 2 mL sterile water was added in control

flasks. The control flasks without fungal inoculation were set along with the fungal pretreatment flasks (Wan & Li, 2010a). All flasks were incubated at 28°C for 28 d.

Six flasks were incubated for each culture condition. Three of them were used for enzyme extraction and assays. Three were used for determination of components in the solid samples, enzymatic hydrolysis and BMP after the incubation time. Four control flasks were performed, two of them were served as control for enzyme extraction and assays, two of them were used for other experiments (Determination of components of the substrates, enzymatic hydrolysis and BMP). For the control and pretreatment flasks for determination of components in samples, enzymatic hydrolysis and BMP, they were dried at 60°C for 72 h after the incubation.

Moreover, autoclaved samples were also prepared to investigate the effect of sterilization by autoclaving on the biochemical contents. Autoclaved samples were samples mixed with distilled water with a weight ratio of 10:30 (sample : water) undergoing the autoclaving process at 121°C for 30 min. Afterwards, the flasks containing autoclaved samples were dried at 60°C for 72 h.

VIII.3.3. Enzyme extraction and assays

For enzyme extraction and assays, the contents of control and pretreatment flasks were suspended in 120 mL sodium acetate buffer (4.102 g L⁻¹, pH 4.5) and incubated in a shaking water bath at 150 r min⁻¹ at 28°C for 4 h (Wan & Li, 2010a). Then the extracts were filtered through 0.45 µm membranes. The enzyme assays were determined by a UV spectrophotometer (SHIMADZU UV-2450).

Manganese-dependent Peroxidase activity (MnP) was determined by phenol red oxidation ($\epsilon=22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Khindaria et al., 1994; Vicentim & Ferraz, 2007). Laccase activity was determined by oxidation of 2,2'-azino-bis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS, $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bourbonnais & Paice, 1990; Wan & Li, 2010a). Filter paper activity was used to measure cellulase activity using International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) guidelines (Ghose, 1987).

VIII.3.4. Determination of components of the substrates

a. Extractives, structural carbohydrates and lignin analysis

After drying, total solid was determined. Weight loss was calculated as the percentage of total solid loss after fungal pretreatment.

The samples were extracted successively with HPLC grade water and with a volume fraction of 99.9% ethanol using the Dionex ASE 350 system following NREL Laboratory Analytical Procedure (Sluiter

et al., 2005). Extractives free samples were used to determine cellulose, hemicellulose and lignin by according to NREL Laboratory Analytical Procedure (Sluiter et al., 2008). The samples were hydrolyzed with a mass fraction of 72% sulphuric acid at 30°C for 1 h. The acid was diluted to a final mass fraction of concentration of 4% with the addition of 84 mL water, and the mixture was autoclaved at 121°C for 1 h. The residue was cooled and filtered. The acid insoluble residue was dried at 105°C overnight, after which it was placed in a furnace at 575°C for 24 h. The difference between the weight of dried solids and that of the ash was determined as acid insoluble lignin. Acid soluble lignin was determined by measuring the UV absorption of the acid hydrolysis supernatant at 205 nm. Monomeric sugars (glucose, xylose, galactose, arabinose and mannose) were measured with a HPLC Waters® equipped with Bio-Rad Aminex HPX-87P column and refractive index detector (RID) at 85°C and 49°C, with HPLC grade water as the mobile phase, eluting at 0.6 mL min⁻¹. Cellulose and hemicellulose concentrations were calculated from the corresponding monomers.

b. Elemental analysis

Total carbon (C), hydrogen (H) and Nitrogen (N) were determined by the oxidation products from dry combustion at 1050°C. Elemental oxygen (O) was also determined by the oxidation product from pyrolysis at 1080°C (LECO element analyzer, model 600) by SCA CNRS, Villeurbanne, France.

VIII.3.5. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was carried out following the NREL procedure (Selig et al., 2008). The samples were diluted to 15 g L⁻¹ in a 12.9 g L⁻¹ sodium citrate buffer (pH 4.8). The cellulase (Sigma-Aldrich) and the β -glucosidase (Sigma-Aldrich) loadings were 60 FPU g⁻¹cellulose and 64 ρ NPGUg⁻¹cellulose, respectively. Hydrolysis experiments were conducted in a shaking water bath at 150 r min⁻¹ and 50°C. After 168 h, the reaction was terminated by transferring the mixture to boiling water for 5 min to deactivate the enzymes. The supernatant of each sample was filtered through 0.22 μ m filters. The soluble glucose in the enzymatic hydrolysate was measured by HPLC Waters® using a Bio-Rad HPX-87H column and refractive index detector (RID) that were maintained at 45°C and 30°C, respectively. 0.49 g·L⁻¹ H₂SO₄ was used as the mobile phase, eluting at 0.6 mL min⁻¹. The percent digestibility of the cellulose was determined as follows:

$$\% \text{ Enzymatic cellulose degradation (ECD \%}_{\text{cell}}) = \frac{\text{cellulose digested (g)}}{\text{cellulose added (g)}} \times 100 \quad (1)$$

VIII.3.6. Biochemical methane potential

Biochemical methane potentials (BMP) were determined from the adapted method developed by Angelidaki et al. (Angelidaki et al., 2009). The nutrient medium was prepared according to the standard procedure ISO 11734 (ISO, 1998) dedicated to the evaluation of the anaerobic

biodegradability of organic compounds in digested sludge. BMP batch tests were investigated with a volatile solid (VS) of samples to VS of inoculum ratio of 0.5. Samples were suspended in 200 mL of nutrient medium and 100 mL of inoculum suspension in 500 mL serum bottles. To insure anaerobic conditions, bottles containing tested materials and nutrient medium were flushed with a gas mixture of 70% N₂ and 30% CO₂ for 5 minutes after introducing inoculum. The bottles were sealed with air-tight rubber stoppers and plastic seals, and incubated for 45 d at 35 ± 2°C in the dark. Methane production was monitored using a Digitron® 2085P pressure transducer. Gas composition was periodically analyzed with an Agilent® gas micro-chromatograph with thermal conductivity detectors and equipped with a Poraplot U column for CO₂ and H₂S separation and a Molsieve column for O₂, N₂, and CH₄. BMP was then calculated from the recorded data and expressed in L kg⁻¹ of VS at 0°C and 10⁵ Pa.

Experimental data of cumulative total methane production was tested on first order kinetics (eq.2):

$$V(t) = V_{\max} (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

where $V(t)$ was the cumulative methane production reached at time t , V_{\max} ($L_{CH_4} \cdot kg_{VS}^{-1}$) the ultimate methane production potential, and k the first order kinetic constant (d^{-1}) of biodegradation.

The best fit values of the parameters were determined by applying a least squares fit of the above equations to each data set using Microsoft Excel's solver function. Ultimate anaerobic potentials used for regressions were calculated from the average of the last two points of cumulative production data.

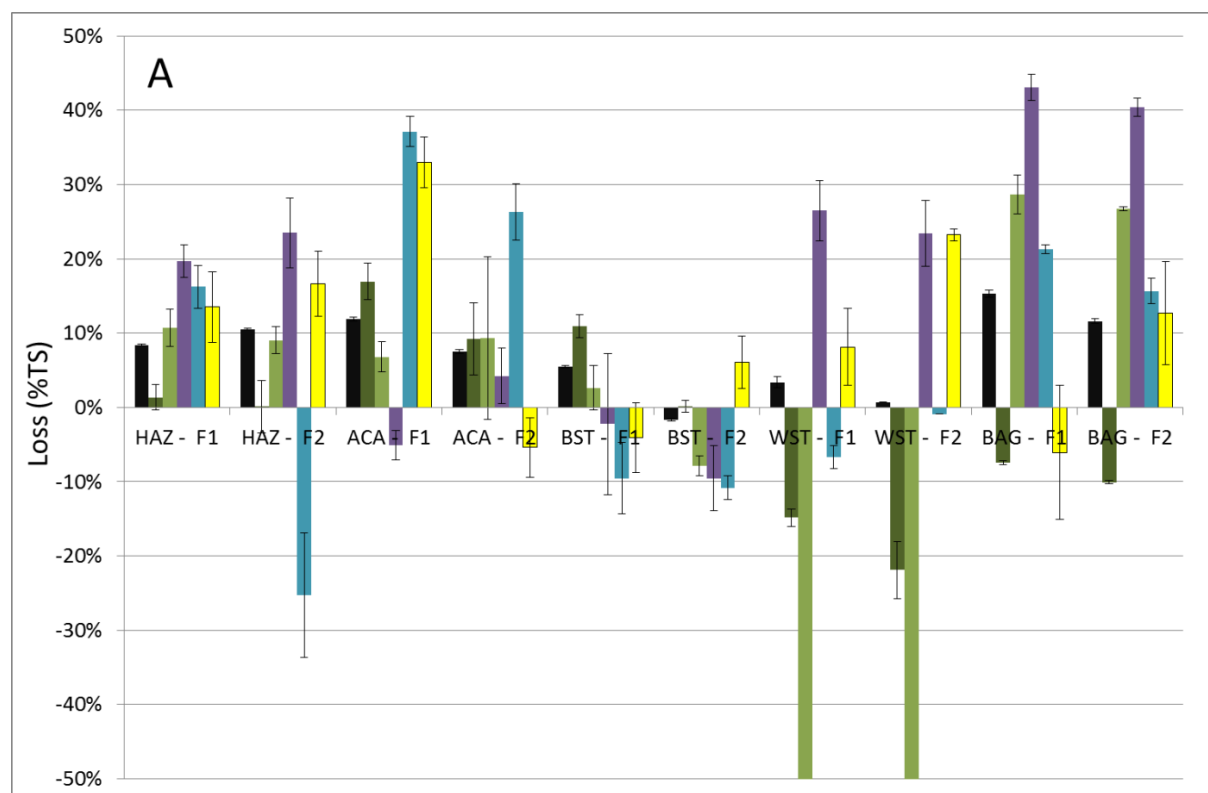
VIII.4. Results and discussion

VIII.4.1. Effect of fungi F1 and F2 on biomass composition after 28 d incubation

The content of the 5 samples in cellulose, hemi-cellulose, lignin and extractives with water and ethanol were assayed after 28 d incubation in presence of the F1 and F2 fungi. The assays were also carried out on the untreated samples and controls in order to assess the impact of the autoclaving process (A) and 28 d incubation without fungi addition (CTL). Since significant changes to the materials were recorded after autoclaving and incubation (Suppl. Table 1 and Suppl. File 1) and were often at the opposite of those induced by fungi, the results achieved after fungal pretreatment were expressed (Fig 1) relatively to the measurements on the controls without inoculum.

a. Total weight loss

The overall mass loss (Fig 1) due to the action of the fungi varied from 8 to 12% for Acacia and Hazel, reaching 15% for Bagasse compared to the condition without fungi. Since the analysis was performed on the sample directly after pretreatment and therefore without removal of the fungal biomass, it is estimated that the loss is related to the release of volatile molecules and/or gases including CO₂ which is the major constituent from metabolic activity. Losses or mass gains are lower than 5% for straw samples Barley straw and Wheat straw. Comparing the two strains, the effect was greater with F1 than with F2 except for Hazel sample leading to an opposite result.



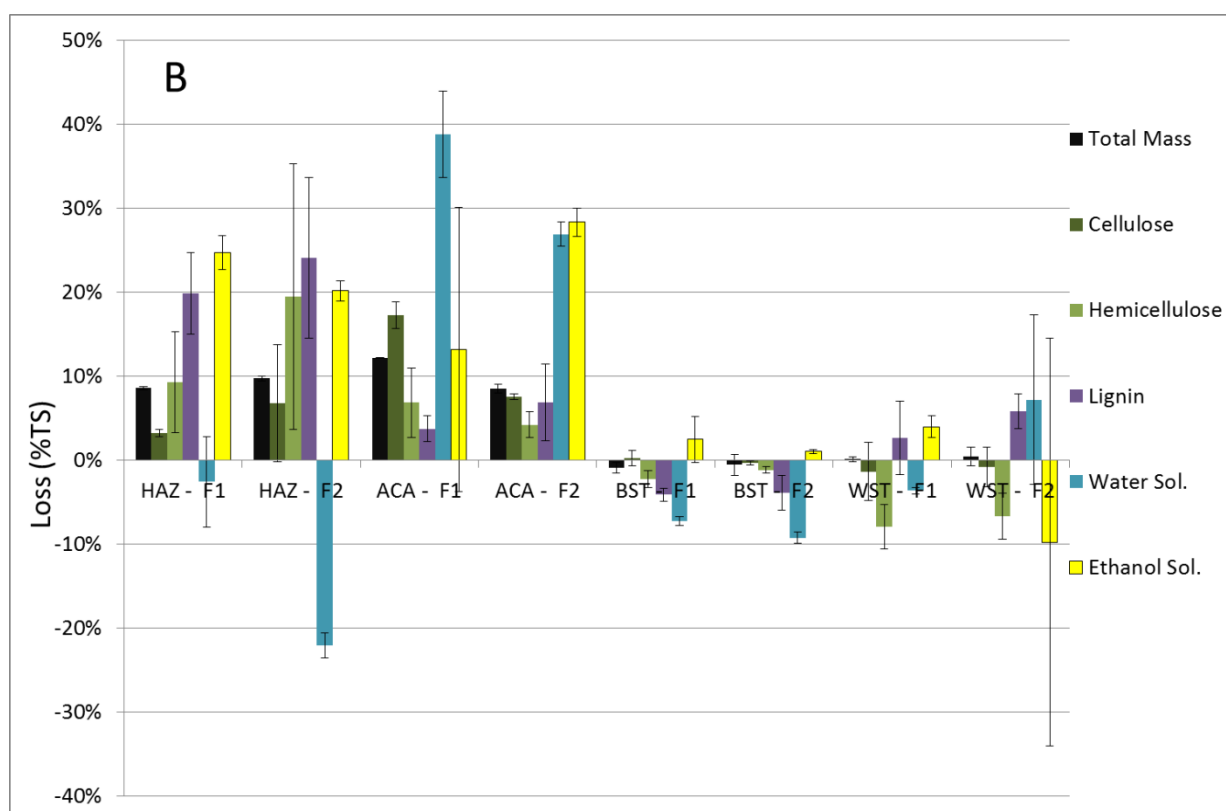


Figure 1. Total mass loss and different losses (in % of initial total solid) in cellulose, hemicellulose, lignin and extractives in water and ethanol due to fungi F1 and F2 growing on grounded particles of 1 mm (A) or 4 mm (B) of Hazel (HAZ), Acacia (ACA), Bagasse (BAG) and Barley or Wheat straw (BST or WST respectively).

b. Aqueous extractives

A loss of 16-39% of these extractives is recorded for Acacia and Bagasse, again for F1. This suggests that the formerly extractable molecules (representing 3 to 6% of the TSi) were assimilated by the fungal biomass. The loss increases to 16% for 1 mm-Hazel particles in presence of F1 and, on the contrary, a gain of up to 25% is recorded for Hazel (1 to 4 mm) in presence of F2. Thus F2 would release more soluble molecules such as acetic acid instead of CO₂ during its metabolism, which explains the lower loss of overall biomass with this fungus. The gains/losses are lower for straw and represent, as Hazel, a variation of less than 1.5% of the TSi.

c. Alcohol extractives

A general loss of 13 to 33% is recorded for Acacia and Hazel whatever the fungi and for Bagasse and Wheat straw 1 mm in presence of F2. For other samples, the gain or loss is lower than 10%. However, for all biomass, the variations are quite low *i.e.* less than 1% of the TSi.

d. Cellulose

A loss of 8 to 17% of cellulose was observed for Acacia, *i.e.* between 2 and 6% of the TSi, and 2-fold higher for F1. A same trend was recorded for Barley straw 1 mm with much higher losses: up to 11% of cellulose whatever the presence of F1 or F2. Lower losses (max 7%) are recorded for Hazel whatever the particle size *i.e.* 1-2% of the TSi (depending on the fungus type). The overall cellulose loss for Hazel and Acacia, correspond to a maximum of 19% of cumulated losses regarding the 5 fractions assayed for Hazel and up to 30-57% for Acacia. The behavior for Bagasse and Wheat straw 1mm is different with apparent increase of 10 and 22% of the cellulose content *i.e.* about 3 and 6% of the TSi respectively.

e. Hemicellulose

Relatively low losses (representing less than 1.4% of the TSi) and significantly lower than cellulose are measured for the hemicelluloses from Acacia: loss of 4-9% of hemicellulose compared to the control without fungi. On the contrary, losses higher than those regarding cellulose are recorded for Hazel (loss of 9-19% relative to the initial hemicellulose content or in absolute 1.3-3.2% of TSi) and up to three times greater for Bagasse (*i.e.* 29% of hemicellulose loss representing about 5.6% of the TSi). Similarly than with cellulose but at a larger extent, the content in hemicellulose measured for Wheat straw 1mm increased by almost 90%, *i.e.* 9-11% of the TSi, whatever fungi involved. However, the hemicellulose in the larger particles of Wheat straw as well as that of Barley straw are less affected.

f. Lignin

A general loss of lignin is measured for all biomass e.g. from 4 to 7% for Acacia and large particles of Wheat straw (*i.e.* 0.4 to 1.4% of the TSi). It raised up to 43% lignin loss for Bagasse by comparison to

the results in standard conditions without fungi; which represents an absolute mass loss of about 5.4% of the bagasse. The samples Hazel and Wheat straw 1 mm reached intermediate results: 20-26% relative loss of lignin *i.e.* the equivalent of 4 to 6% of the initial mass. It should be noticed that in the case of Hazel, the lignin loss represents over 50% of the cumulative mass loss regarding the 5 fractions.

g. Global discussion

The cumulative losses for the 5 fractions assayed varied from 6 to 14% of the TSi for Hazel, Acacia and Bagasse. They should be compared with the 10% TSi *i.e.* about 1 g of organic matter that was lost due to the fungi metabolism. Therefore we can assume that the mass balance is relatively well completed on these five fractions and moreover that only a small amount of mass has been converted into cell biomass or non-volatile by-products during 28 d of incubation. Regarding the straw samples, the cumulative loss or gain over the 5 fractions assayed does not globally exceed 4% of the TSi. This is to compare with the overall weight loss of maximum 5% recorded for 1mm Barley straw in presence of F1 or those quite low for the other straw samples. This suggests a limited effect of the fungi on these materials except for 1mm Wheat straw that often behaved differently when comparing with the other straw samples. Therefore, different fungal effects were observed on the different lignocellulosic biomass even though the same fungus strain was used for pretreatment. Similar results were reported in the literature. Indeed, the total solid loss of Corn stover, Switchgrass and Hardwood pretreated by F2 for 18 d were between 10% and 15%, while regarding Wheat straw, Soybean stalk, their mass loss were close to 5% (Wan & Li, 2011b). Regarding Wheat straw, higher results of 7.5% were reported after 49 d of incubation in presence of *C. subvermispora* (Tuyen et al., 2012). By contrast, Japanese cedar wood seems more resistant with only 0.9% and 1.1% of mass loss observed after 28 d fungal pretreatment by F1 and F2, respectively (Amirta et al., 2006).

Moreover the loss in lignin and cellulosic/hemicellulosic compounds of Hazel are in the range of 55-92% and 22-50% respectively of the cumulative loss over the 5 fractions whereas Acacia shows a fundamentally different trend with losses in the range 6-17% and 37-65%. Regarding Bagasse, hemicellulose and lignin losses are relatively close to 40% for each of the compounds with an equivalent loss of aqueous extractive and a gain of about 10% of C6 carbohydrate compounds (dextrose). By contrast, trends are difficult to evidence for straw with relatively low levels of absolute weight losses. These results are consistent with those of Blanchette et al. (1985) who reported that delignification is not uniformly distributed in wood decayed in the forest since several white-rot fungi exhibited selective lignin removal in certain wood but not in some other wood. Moreover, the type of degradation performed by white-rot fungi that can either remove all cell wall components or selectively remove only lignin or hemicellulose may result from substrate or environmental factors that influence fungal physiology (Blanchette et al., 1985).

Comparing the two fungi, it may be noted that the overall impact is relatively similar with some cases a higher impact of F2 on lignin compounds and of F1 on cellulose and other compounds. In addition, F2 metabolism would excrete more soluble compounds than CO₂, which is an advantage for anaerobic digestion. It is suggested that the significant behaviors of selective lignin degradation by F1 and F2 on Hazel and Bagasse samples should be related to a relatively low accessibility to cellulose (Section 3.3.). A ratio of lignin loss to cellulose loss was estimated according to other authors. It was higher (i.e. 4.1) for 1 mm Hazel pretreated with F2 than the 3.4 ratio observed with 4 mm Hazel pretreated with F2 or 1 mm Bagasse with F1. Regarding Wheat straw, different results have been observed due to gain of cellulose (i.e. -1.7 ratio for 1 mm pretreated by F1). They are to compare with the 22.5 ratio reported for *C. subvermispora* strain MES 13094 after 49 d incubation (Tuyen et al., 2012). On the contrary, the lignin/cellulose loss ratio of Wheat straw pretreated by *C. subvermispora* (Strain F2) for 18 d was close to 3 (Wan & Li, 2011b). Moreover the ratio for 5 mm, 10 mm and 15 mm corn stover pretreated for 18 d by the same *C. subvermispora* strain as F2 were 6.40, 4.76 and 3.95, respectively (Wan & Li, 2010b). It is suggested that the selective delignification capacity of *C. subvermispora* depend not only on the fungus strain but also on the type and particle size of lignocellulosic biomass.

VIII.4.2. Enzyme production

In this study, no cellulase determined as FPU activity was detected, which is consistent with several reports earlier (Wan & Li, 2010a). Indeed small amounts of endoglucanase and no cellobiohydrolase were detected during cultivation of wood chips by *C. subvermispora* (Heidorne et al., 2006).

Ligninolytic enzymes laccase and manganese peroxidase (MnP) secreted by F1 and F2 strains in all lignocellulosic biomass were determined after 28 d fungal pretreatment. Laccase activity was detected under all the experimental conditions tested while significant differences of laccase activity were observed between 1 mm and 4 mm samples of Acacia, Barley straw and Wheat straw. The results suggest that laccase is the basal enzyme for *C. subvermispora*. They are however contradictory to some studies reported in the literature. Indeed, no laccase activity was detected from Soybean stalk pretreated by the same F2 strain (Wan & Li, 2011b). Likewise, no laccase was detected after the fungal pretreatment on *Pinus taeda* wood chips for 10 d (Aguiar et al., 2010). Regarding peroxidase, MnP secreted by both strains were detected in 1 mm and 4 mm Hazel and 1 mm Bagasse. However, in the case of Barley straw, only MnP was secreted by F1 from 1 mm sample (no MnP activity was detected in 4 mm Barley straw nor from F2 on Acacia or Barley straw). Thus, although both F1 and F2 are fungi of the same species, they showed different sensibility of secretion of MnP related to culture conditions. Therefore, it is proposed that the secretion of MnP and laccase depend on both the type and particle size of lignocellulosic biomass.

MnP activity values in the cases of 4 mm Hazel pretreated by F2, 1 mm Barley straw pretreated by F1 and 1 mm Bagasse pretreated by F2 were similar to the result reported with 0.16 U/g solid wood chips (de Souza-Cruz et al., 2004). The highest activity recorded for Hazel sample was related to F2 on 4 mm Hazel particles. It was 2.6 times higher than that measured in 4 mm F1 pretreated sample that was slightly higher than that related to 1 mm sample whatever the presence of F1 or F2. Therefore, 4 mm Hazel unlike Barley straw would be more favorable to stimulate MnP production than 1 mm. Moreover, MnP activity of F2 would be more efficient than that of F1 on both Hazel and Bagasse since in the case of Bagasse it was 2.8 times higher than that related to F1.

As suggested by other authors, MnP production could be related to the high C/N ratios of Hazel, Barley straw and Bagasse (Table 1), which could promote lignin degradation (Kluczek-Turpeinen, 2007; Tian et al., 2012). Our results indicate that both substrate type and particle size could affect the level of MnP activity. These results are consistent with those of Wan and Li with no MnP activity recorded from Wheat straw and Soybean stalk pretreated by F2 (Wan & Li, 2011b). Similar results were reported by Wang et al. (2002) since they did not detect MnP activity in four out of ten strains of another white-rot fungus *Bjerkandera adusta* tested in 3% rice bran medium (Wang et al., 2002).

On the other hand, laccase activity values were lower compared to the 0.68 and 2.4 U/g reported by others (Enoki et al., 1999; Wan & Li, 2010a). In our studies, the highest laccase activities 0.21 U/g solid were recorded for F1 in 1 mm particles of Barley and Wheat straw. They were close to the 0.25 U/g solid reported by Ferraz et al. (2003) after 30 d fungal pretreatment by *C. subvermispora* on *Eucalyptus grandis* wood chips (Ferraz et al., 2003). The lowest laccase activity with 0.01 U/g solid was observed under the culture condition of 4 mm Wheat straw pretreated by F2. The laccase activities secreted by F1 in 1 mm and 4 mm Hazel were similar (*i.e.* 0.14 and 0.13 U/g solid, respectively), whereas as for F2, it was 1.8 times higher in 4 mm Hazel particles than in 1 mm particles (0.06 U/g solid). Regarding Acacia, the activities of laccase produced by F2 were higher than those by F1 whatever the particle size. Likewise, the activities of laccase detected in 4 mm Acacia were higher than those detected in 1 mm sample for either strain. By contrast, the trends were opposite regarding Barley straw and Wheat straw, with laccase activities detected in 1 mm samples that were 1.5 to 5-fold higher respectively than those detected in 4 mm samples depending on fungal strain. These results for Wheat straw should be related to the significantly higher lignin loss recorded on 1 mm particles (*i.e.* 4 to 10-fold higher) than on the larger particles. Comparing the fungal strains, the laccase activity of F1 was 4.2 times higher than that of F2 for 1 mm particles of Wheat straw and up to 10 times higher for 4 mm particles. Similar trend but at lower extent was recorded for Hazel particles. On the contrary, the laccase activity produced by F2 on 1 mm and 4 mm particles of Acacia was 3.7 and 2.1 times higher than those produced by F1 and that on Bagasse with F2 was 2-fold higher than that of F1.

In the presence of both MnP and laccase, laccase was generally the dominant enzyme except under the culture conditions of 4 mm Hazel pretreated by F2 and 1 mm Bagasse pretreated by F2, which might be related to the cultivation time. Indeed it is proposed that MnP should be the dominant enzyme during the first 20 d cultivation, afterwards laccase activity should increase and become dominant enzyme (Vicentim & Ferraz, 2007; Wan & Li, 2010a). From the results of components loss (Fig. 1), no clear correlation was observed between ligninolytic enzyme activity values and the extent of lignin degradation. For instance, MnP and laccase activities of F2 in 1 mm Hazel were much lower than those of F2 in 4 mm Hazel, however, there was no much difference of the extent of lignin degradation between the two cases. These results are consistent with those of Aguiar and Ferraz (2012), who reported that lignin degradation was not stimulated, even though the MnP levels was increased in the cultures amended with oxalic acid (Aguiar & Ferraz, 2012). However, the significant selectivity of lignin degradation on Hazel and Bagasse (up to about 20 and 40% respectively of the lignin degraded after 28 d of incubation whatever the fungal strain or particle size) would be caused by the synergistic effects of MnP and laccase (Wan & Li, 2011b). This confirms the hypothesis of Schmutzer et al. about the cumulative activity of total peroxidase secreted by five white rot fungi correlated with the amount of lignin metabolised or solubilised after 10 d fungal pretreatment on spruce wood (Schmutzer et al., 2008).

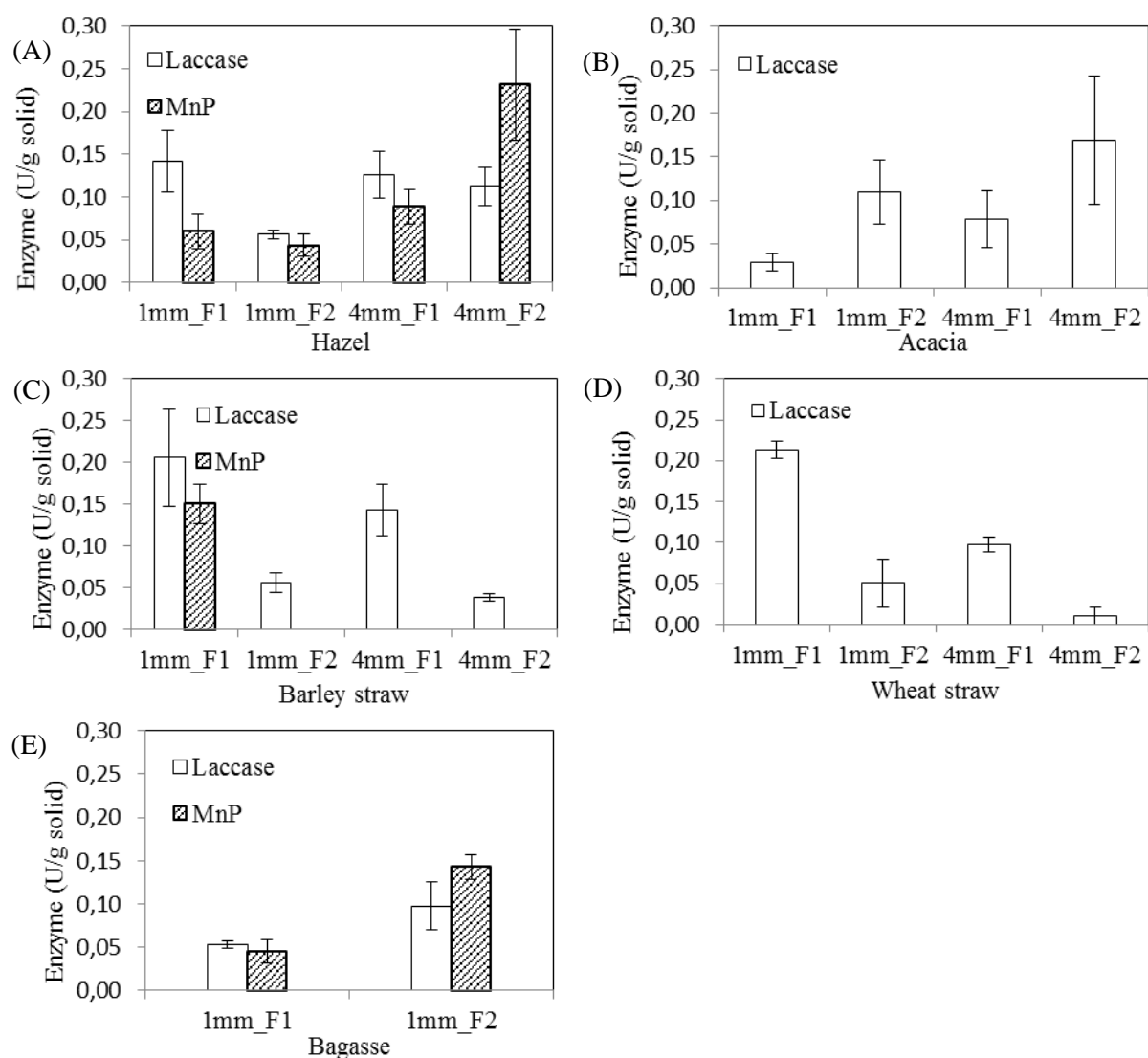


Figure 2: Production of Laccase and MnP after 28 d pretreatment: (A) Hazel, (B) Acacia, (C) Barley straw, (D) Wheat straw and (E) Bagasse.

VIII.4.3. Enzymatic hydrolysis and BMP

a. Enzymatic hydrolysis

ECD procedure was carried out to assess cellulose accessibility after the different pretreatments carried out on the five biomasses. The results (Fig. 3) were compared with the biogas potentials measured through BMP assays (Section 3.3.2. and 3.3.3.).

The particle size affects slightly the enzymatic hydrolysis results of untreated samples. Indeed, for all the untreated samples, the ECD of 1 mm samples were slightly higher than those of 4 mm. Hazel and Bagasse are less hydrolysable than the other samples since only 8.8%, 8.4% and 11.7% of the initial cellulose were hydrolysed through the ECD test carried out on untreated 1 mm and 4 mm Hazel particles and 1 mm Bagasse samples, respectively. These are much lower than those of Acacia, Barley straw and Wheat straw samples with approximately 20% of the initial cellulose that was hydrolysed by cellulases of the ECD test.

Autoclaving process has generally impact on cellulose accessibility. The ECD of all autoclaved samples increased compared to their corresponding untreated samples. It is suggested that thermal pretreatment could alter the structure and properties of lignocellulose and therefore result in more accessible cellulose (Martín-Sampedro et al., 2012). Moreover the ECD of autoclaved samples increased at different extent compared to untreated samples. The maximum increase was recorded for Bagasse with 57.3% and the minimum increase was for 4 mm Wheat straw with 12%.

The comparison between ECD result of autoclaved sample and that of control sample (incubation without fungi) for each biomass indicates that the contact with water for 28 d could influence cellulose accessibility to enzymatic hydrolysis. Indeed the ECD of Wheat straw control and that of Bagasse control samples increased significantly, meanwhile, the ECD of 4 mm Acacia control and that of 4 mm Barley straw control decreased significantly. As for 1 mm Barley straw, 1 mm Acacia and both 1 mm and 4 mm Hazel samples, the cellulose accessibility of each control sample only changed slightly compared to the corresponding autoclaved sample.

After fungal pretreatment with F1 or F2, the ECD of Hazel whatever the particle size and Bagasse increased significantly. The ECD results on 1mm Hazel particles pretreated by F1 and F2 were 2.8 and 4.4-fold higher respectively than on 1 mm Hazel control sample. Regarding 4 mm Hazel particles, the results were 3.1 times and 4.2 times higher, respectively. Lower differences were recorded for Bagasse samples pretreated by F1 or F2 *i.e.* 2.1 and 1.9 higher than in controls. It is suggested that large lignin degradation by fungi on Hazel and Bagasse samples caused an increase of cellulose accessibility since only a low cellulose degradation was recorded (less than 7 % of the initial content or 2% of the total initial dry weight) during the 28 d incubation with both fungi. By contrast, regarding Acacia samples,

the significant decrease of cellulose accessibility, particularly after pretreatment with F1 strain should be related to the high cellulose degradation observed. Indeed, the 17 and 9% cellulose degradation in 1 mm particles of Acacia after 28 d incubation in presence of F1 and F2 respectively lead to ECD results 72.8% and 28.7% lower compared to 1 mm Acacia control sample. Similar results were achieved with the 4 mm Acacia samples with 65.2% and 16.4% lower ECD results than the control, respectively. The trend is confirmed regarding the straw samples, since the changes of ECD after fungal pretreatment with F1 or F2 are irregular in relation to the direct cellulose degradation level by the fungi. The effects of pretreatment by each fungus on cellulose accessibility also depended on particle size of both straw samples. By contrast, no differences of glucose yield through enzymatic hydrolysis were observed among three particle sizes of corn stover pretreated by F2 for 35 d (Wan & Li, 2010b). However, the ranges of particle sizes were quite different since they considered particles from 5 to 15 mm. Moreover, our results showed that the effect of fungal pretreatment also depends on the lignocellulosic biomass type. Similar results have been reported. The glucose yield of corn stover pretreated by F2 increased significantly compared to untreated sample, while in the case of Wheat straw and Soybean straw, the glucose yield increased slightly (Wan & Li, 2011a).

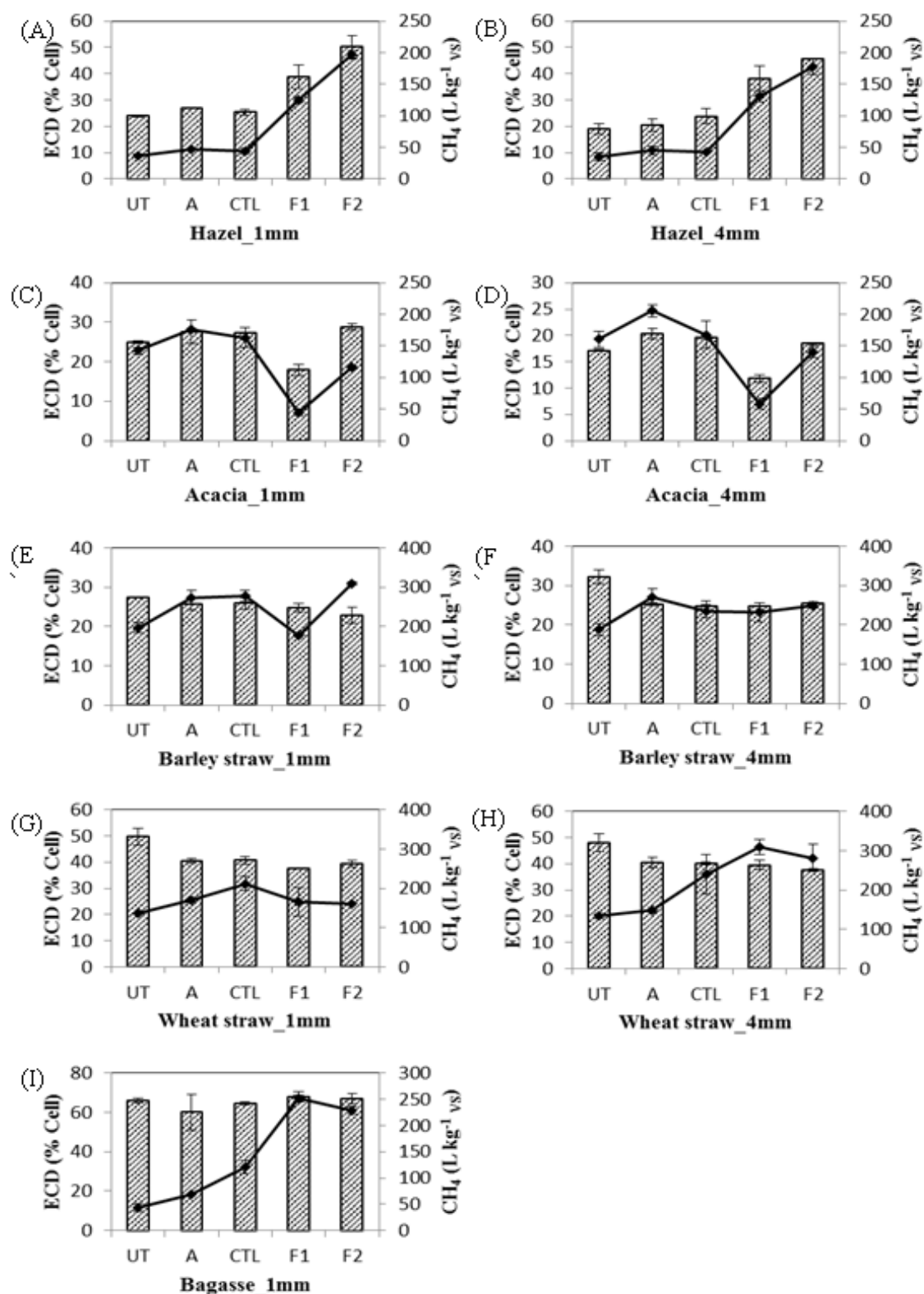


Figure 3: Results of enzymatic hydrolysis (diamonds) and BMP (columns): (A) Hazel_1mm, (B) Hazel_4mm, (C) Acacia_1mm, (D) Acacia_4mm, (E) Barley straw_1mm, (F) Barley straw_4mm, (G) Wheat straw_1mm, (H) Wheat straw_4mm and (I) Bagasse_1mm. UT: untreated; A: autoclaved; CTL: control.

b. BMP

Anaerobic digestion of all samples was conducted to evaluate methane potential. First order kinetic models were used to characterize the methane production of all samples (Table 2).

Table 2. BMP kinetic parameters.

Sample	$V_{\max} (L \cdot kg_{VS}^{-1})$	$k (d^{-1})$
Hazel_1 mm		
UT	109.8	0.049
A	131.9	0.048
CTL	131.5	0.042
F1	173.9	0.070
F2	219.6	0.084
Hazel_4 mm		
UT	93.3	0.043
A	98.6	0.054
CTL	119.9	0.042
F1	164.2	0.089
F2	195.9	0.087
Acacia_1 mm		
UT	149.6	0.107
A	173.2	0.100
CTL	169.9	0.088
F1	138.9	0.041
F2	204.5	0.054
Acacia_4 mm		
UT	135.9	0.120
A	172.4	0.080
CTL	164.5	0.083
F1	109.4	0.054
F2	185.0	0.044
Barley straw_1 mm		
UT	293.7	0.087
A	260.0	0.125
CTL	258.1	0.121
F1	246.5	0.093

F2	227.2	0.124
Barley straw_4 mm		
UT	330.8	0.086
A	251.1	0.104
CTL	245.4	0.112
F1	248.3	0.097
F2	250.1	0.108
Wheat straw_1 mm		
UT	338.9	0.095
A	270.1	0.104
CTL	268.5	0.111
F1	250.3	0.086
F2	259.0	0.108
Wheat straw_4 mm		
UT	331.7	0.078
A	274.5	0.085
CTL	275.8	0.080
F1	263.2	0.093
F2	248.2	0.102
Bagasse_1 mm		
UT	247.9	0.114
A	216.4	0.183
CTL	233.1	0.160
F1	238.9	0.202
F2	239.4	0.208

Regarding the untreated Hazel, Acacia and Wheat straw samples, the methane yield of 1 mm sample was slightly higher than that of the corresponding 4 mm sample, which indicates that size reduction from 4 mm to 1 mm could only improve methane production slightly. However, in the case of Barley straw, 4 mm untreated sample produced a little more methane compared to 1 mm sample.

The methane yield of untreated forestry samples Hazel and Acacia were less than that of untreated agricultural sample. Moreover, it is obvious that Hazel is the least biodegradable among the five biomasses. Its kinetic constant k was relatively low compared to that of the other biomass. On the other hand, the kinetic constant k of Acacia whatever the particle size was close to those of agricultural residues, although the methane potential of Acacia was lower. The ranges of kinetic constants in our study were similar to those reported by Gunaseelan (2004).

Regarding Hazel and Acacia, the methane yields of autoclaved and control samples were slightly higher than those of the corresponding untreated samples. Opposite trends were recorded for both straws and Bagasse samples. However as seen from Fig. 3, there was no significant difference in methane yields between autoclaved and control samples whatever the biomass sample. In terms of kinetic constant, the value for autoclaved Acacia was slightly lower than that of untreated Acacia, and for Bagasse, the kinetic constant of autoclaved sample was significantly higher. Whatever the type of biomass, there was no significant difference of kinetic constant between autoclaved and control sample, indicating that the process of incubation for 28 d in presence of water but without fungi has no significant impact on the rate of methane production during further anaerobic fermentation.

Fungal pretreatment showed different effects on methane production for both forestry residues. Indeed, after fungal pretreatment with F1 or F2 and subsequent 45 d methane fermentation, the methane yield of Hazel samples, whatever the particle size, increased significantly. The methane yield of 1 mm Hazel pretreated with F1 or F2 increased by 52.8% or 97.5% compared to the 1 mm control sample, respectively. Regarding 4 mm Hazel samples, 60.7% or 92.1% of increase of methane yield were recorded with F1 or F2, respectively. As shown in Table 2, fungal pretreatment also improved kinetic constant of Hazel samples significantly. This enhancement of methane production from fungal pretreated samples was attributed to degradation of lignin. However, it seems that the extent of degradation of lignin is not the only factor that could impact the extent of increase of methane yield since whatever the particle size no significant difference in lignin content was evidenced after Hazel pretreated by F1 or F2. In addition, regarding Acacia, methane yield after pretreatment with F1 was significantly lower compared to Acacia control sample whatever the particle size, whereas no significant difference was measured between the methane yields from F2 pretreated sample and the control. Therefore F1 would have a direct impact on anaerobic digestion. Different results were reported about methane fermentation of Japanese cedar wood carried out after pretreatment with three

strains of *C. subvermispota* i.e. the same F1 and F2 strains as in our experiences and the strain CBS 347.63 (Amirta et al., 2006). The methane yield from Japanese cedar wood pretreated by F1 was slightly higher than that of wood pretreated by F2 (Amirta et al., 2006). Moreover, since the resulting lignin content of Acacia samples after incubation with F1, whatever the particle size, was slightly higher than that of F2 pretreated samples, and consequently lower methane yield was recorded from F1 pretreated Acacia samples than from F2 pretreated Acacia samples, it is confirmed that F1 and F2 would have different metabolisms even on the same forestry residue. These results suggest to a certain extent some inhibition of anaerobic digestion by secondary metabolites produced by F1.

On the other hand, fungal pretreatment also showed different effects on the three agricultural residues. In the case of Bagasse, as shown in Table 2, fungal pretreatment lead to a higher kinetic constant than in control, although no significant difference was observed in methane yield between control and fungal pretreated samples. Regarding both straw biomasses, the methane yields of fungal pretreated samples were slightly higher than in control tests whatever the particle size. The differences are however significantly lower than those reported by Tuyen et al. (Tuyen et al., 2012) who achieved a total gas production ranging from 200 to 309 mL/g Wheat straw without and after pretreatment with *C. subvermispota* for 49 d.

c. ECD & BMP

As shown in Fig. 3, the trends of ECD curves (versus experimental conditions from untreated biomass to biomass pretreated with F1 and F2) related to Hazel and Acacia samples are in accordance with those of BMP whatever the particle size. These relations between ECD and BMP results are in accordance with those reported by Rodriguez et al. (2005). In addition, our ECD results were confirmed using the procedure developed by Rodriguez et al. with both cellulases and hemicellulases enzymes. Indeed, the accessibility to cellulose and hemicellulose were improved by the same extent (Suppl. Table 3). It should be noted that while there was no significant difference of lignin removal between F1 and F2 pretreated Hazel samples whatever the particle size, the accessibility to cellulose of Hazel after pretreatment by F2 was much higher than after pretreatment by F1. This further resulted to significant increase of methane yield on Hazel sample pretreated by F2. Regarding Acacia, the lower methane yield from F1 pretreated samples compared to control sample might be due to the lower accessibility to cellulose measured on this F1 pretreated sample whereas lignin degradation was observed comparing to control. This decrease of cellulose accessibility in Acacia should be related to the 17% cellulose degradation by F1. On the other hand, regarding each agricultural biomass, the variation of methane yield after different treatment of samples of the same biomass was less fluctuant than that of ECD, especially for Bagasse. It could be due to some sucrose trapped in cellulose fibers that could be converted into methane but is not taken into account in ECD test.

Although the accessibility to cellulose of untreated Hazel sample was similar to that of untreated Bagasse sample, it is possible that low accessibility to cellulose could be caused by different reasons. In the case of Hazel, it is suggested that recalcitrant structure principally results in low accessibility to cellulose. However, for “false recalcitrant” Bagasse, some sucrose trapped in cellulose might be major reason. Therefore, for “real recalcitrant” biomass, like Hazel, it is proposed that improving cellulose accessibility of lignocellulose is more important for promoting methane fermentation than lignin degradation, which was similar to the results reported by Rollin et al. (2011).

VIII.5. Conclusion

It is proposed that the effects of fungal pretreatment depend on the type of lignocellulosic biomass. Fungal pretreatment with *C. subvermispota* could significantly improve anaerobic digestion of Hazel and Bagasse. *C. subvermispota* showed significant capacity to degrade lignin without affecting cellulose on Hazel and Bagasse. It is proposed that the secretion of MnP and laccase depend on both the type and particle size of lignocellulosic biomass. The trends recorded for ECD results carried out after different treatment types (untreated, autoclaved, control, F1 and F2 pretreated samples) of Hazel and Acacia are in accordance with those measured in BMP tests.

VIII.6. References

1. Aguiar, A., Ferraz, A. 2012. Effects of exogenous calcium or oxalic acid on *Pinus taeda* treatment with the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 72, 88-93.
2. Aguiar, A., Mendonça, R., Rodriguez, J., Ferraz, A. 2010. Behavior of *Ceriporiopsis subvermispota* during *Pinus taeda* biotreatment in soybean-oil-amended cultures. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 64(7), 588-593.
3. Akin, D.E., Morrison Iii, W.H., Rigsby, L.L., Gamble, G.R., Sethuraman, A., Eriksson, K.E.L. 1996. Biological delignification of plant components by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Cyathus stercoreus*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 63(1-4), 305-321.
4. Amirta, R., Tanabe, T., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M. 2006. Methane fermentation of Japanese cedar wood pretreated with a white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. *J. Biotechnol.*, 123(1), 71-77.
5. Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J., Guwy, A., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., Van Lier, J. 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci Technol*, 59(5), 927-934.

6. Baba, Y., Tanabe, T., Shirai, N., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T. 2011. Pretreatment of Japanese cedar wood by white rot fungi and ethanolysis for bioethanol production. *Biomass Bioenerg.* 35(1), 320-324.
7. Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.*, 39(12), 1843-1848.
8. Bauer, A., Lizasoain, J., Theuretzbacher, F., Agger, J.W., Rincón, M., Menardo, S., Saylor, M.K., Enguñdanos, R., Nielsen, P.J., Potthast, A., Zweckmair, T., Gronauer, A., Horn, S.J. 2014. Steam explosion pretreatment for enhancing biogas production of late harvested hay. *Bioresour. Technol.*, 166(0), 403-410.
9. Bertrand, V., Dequiedt, B., Le Cadre, E. 2014. Biomass for electricity in the EU-27: Potential demand, CO2 abatements and breakeven prices for co-firing. *Energ. Policy*, 73(0), 631-644.
10. Blanchette, R., Otjen, L., Effland, M., Eslyn, W. 1985. Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. *Wood Sci. Technol.*, 19(1), 35-46.
11. Bourbonnais, R., Paice, M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS letters*, 267(1), 99-102.
12. Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T. 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew Sust Energ Rev*, 16(3), 1462-1476.
13. de Souza-Cruz, P.B., Freer, J., Siika-Aho, M., Ferraz, A. 2004. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. *Enzyme Microb. Technol.*, 34(3-4), 228-234.
14. Dwivedi, P., Alavalapati, J.R.R., Lal, P. 2009. Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. *Energy Sustain. Dev.*, 13(3), 174-182.
15. Enoki, M., Watanabe, T., Nakagame, S., Koller, K., Messner, K., Honda, Y., Kuwahara, M. 1999. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 180(2), 205-211.
16. Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Floudas, D., Hibbett, D.S., Canessa, P., Larrondo, L.F., James, T.Y., Seelenfreund, D., Lobos, S., Polanco, R., Tello, M., Honda, Y., Watanabe, T., Ryu, J.S., Kubicek, C.P., Schmoll, M., Gaskell, J., Hammel, K.E., St John, F.J., Vanden Wymelenberg, A., Sabat, G., Splinter BonDurant, S., Syed, K., Yadav, J.S., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lavin, J.L., Oguiza, J.A., Perez, G., Pisabarro, A.G., Ramirez, L., Santoyo, F., Master, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Lombard, V., Magnuson, J.K., Kues, U., Hori, C., Igarashi,

- K., Samejima, M., Held, B.W., Barry, K.W., LaButti, K.M., Lapidus, A., Lindquist, E.A., Lucas, S.M., Riley, R., Salamov, A.A., Hoffmeister, D., Schwenk, D., Hadar, Y., Yarden, O., de Vries, R.P., Wiebenga, A., Stenlid, J., Eastwood, D., Grigoriev, I.V., Berka, R.M., Blanchette, R.A., Kersten, P., Martinez, A.T., Vicuna, R., Cullen, D. 2012. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(14), 5458-5463.
17. Ferraz, A., Córdova, A.M., Machuca, A. 2003. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 32(1), 59-65.
18. Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martínez, A.T., Otillar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P.M., de Vries, R.P., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J.A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kües, U., Kumar, T.K.A., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L.F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D.J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L.G., Nolan, M., Ohm, R.A., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J.C., St. John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D.C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S. 2012. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science*, 336(6089), 1715-1719.
19. Ghose, T. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.*, 59(2), 257-268.
20. Gielen, D.J., de Feber, M.A.P.C., Bos, A.J.M., Gerlagh, T. 2001. Biomass for energy or materials?: A Western European systems engineering perspective. *Energ. Policy*, 29(4), 291-302.
21. Goshadrou, A., Karimi, K., Taherzadeh, M.J. 2013. Ethanol and biogas production from birch by NMMO pretreatment. *Biomass Bioenerg.*, 49(0), 95-101.
22. Guerra, A., Mendonça, R., Ferraz, A. 2003. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.*, 33(1), 12-18.
23. Gunaseelan, V.N. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass Bioenerg.*, 26(4), 389-399.
24. Heidorne, F.O., Magalhães, P.O., Ferraz, A.L., Milagres, A.M.F. 2006. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, 38(3-4), 436-442.

25. ISO, E. 1998. 11734: 1998–Water quality–Evaluation of the “ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge–Method by measurement of the biogas production (ISO 11734: 1995). German version: DIN EN ISO, 11734.
26. Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. 2003. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *J. Biotechnol.*, 103(3), 273-280.
27. Khindaria, A., Grover, T.A., Aust, S.D. 1994. Oxalate-Dependent Reductive Activity of Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 314(2), 301-306.
28. Kluczek-Turpeinen, B. 2007. Lignocellulose degradation and humus modification by the fungus *Paecilomyces inflatus*. 1-84.
29. Liu, J., Sidhu, S.S., Wang, M.L., Tonniss, B., Habteselassie, M., Mao, J., Huang, Q. 2015. Evaluation of various fungal pretreatment of switchgrass for enhanced saccharification and simultaneous enzyme production. *J. Clean. Prod.*, 104, 480-488.
30. Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., García, J.C., Lopez, F., Villar, J.C., Diaz, M.J. 2012. Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. *Biomass Bioenerg.*, 42(0), 97-106.
31. Monlau, F., Kaparaju, P., Trably, E., Steyer, J.P., Carrere, H. 2015. Alkaline pretreatment to enhance one-stage CH₄ and two-stage H₂/CH₄ production from sunflower stalks: Mass, energy and economical balances. *Chem Eng J.*, 260(0), 377-385.
32. Rodriguez, C., Hilgsmann, S., Ongena, M., Charlier, R., Thonart, P. 2005. Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation*, 16(5), 415-422.
33. Rollin, J.A., Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Zhang, Y.H. 2011. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnol. Bioeng.*, 108(1), 22-30.
34. Saha, B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30(5), 279-291.
35. Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A. 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energ. Environ. Sci.*, 4(4), 1306-1310.
36. Sasaki, C., Takada, R., Watanabe, T., Honda, Y., Karita, S., Nakamura, Y. 2011. Surface carbohydrate analysis and bioethanol production of sugarcane bagasse pretreated with the white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora* and microwave hydrothermolysis. *Bioresour. Technol.*, 102(21), 9942-9946.

37. Schmutzer, M., Schwanninger, M., Fackler, K., Messner, K., Gradinger, C. 2008. Comparison of methods to evaluate the potential of fungal growth on decay of spruce wood after short-time treatment. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 61(4), 319-324.
38. Selig, M., Weiss, N., Ji, Y. 2008. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Laboratory analytical procedure. Technical report: NREL/TP-510-42629. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA.
39. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure. Technical report: NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA.
40. Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2005. Determination of extractives in biomass. Laboratory analytical procedure. Technical report: NREL/TP-510-42619. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA.
41. Tanaka, H., Koike, K., Itakura, S., Enoki, A. 2009. Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.*, 45(5), 384-390.
42. Teghammar, A., Forgács, G., Sárvári Horváth, I., Taherzadeh, M.J. 2014. Techno-economic study of NMMO pretreatment and biogas production from forest residues. *Appl. Energ.*, 116, 125-133.
43. Tian, X.-f., Fang, Z., Guo, F. 2012. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuel. Bioprod. Bior.*, 6(3), 335-350.
44. Tuyen, V.D., Cone, J.W., Baars, J.J., Sonnenberg, A.S., Hendriks, W.H. 2012. Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. *Bioresour. Technol.*, 111, 336-342.
45. Vicentim, M.P., Ferraz, A. 2007. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora* in cultures supplemented with Mn^{2+} , corn steep liquor and glucose. *Enzyme Microb. Technol.*, 40(4), 645-652.
46. Vivekanand, V., Olsen, E.F., Eijsink, V.G.H., Horn, S.J. 2013. Effect of different steam explosion conditions on methane potential and enzymatic saccharification of birch. *Bioresour. Technol.*, 127(0), 343-349.
47. Wan, C., Li, Y. 2011a. Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks. *Bioresour. Technol.*, 102(20), 9788-9793.
48. Wan, C., Li, Y. 2011b. Effectiveness of microbial pretreatment by *Ceriporiopsis subvermispora* on different biomass feedstocks. *Bioresour. Technol.*, 102(16), 7507-7512.
49. Wan, C., Li, Y. 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.*, 30(6), 1447-1457.

50. Wan, C., Li, Y. 2010a. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme Microb. Technol.*, 47(1–2), 31–36.
51. Wan, C., Li, Y. 2010b. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresour. Technol.*, 101(16), 6398–6403.
52. Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., Pickard, M.A. 2002. Purification, Characterization, and Chemical Modification of Manganese Peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr. Microbiol.*, 45(2), 77–87.
53. Zeitoun, R., Pontalier, P.Y., Marechal, P., Rigal, L. 2010. Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: influence on extract purity and purification performance. *Bioresour. Technol.*, 101(23), 9348–9354.
54. Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y. 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog. Energ. Combust.*, 42, 35–53.

VIII.7. Supplementary Tables and Figures

VIII.7.1. Effect of autoclave sterilization and 28 d aqueous incubation on different biomass samples

Suppl Table 1 : Percentage (and standard deviation on triplicates) of initial total solid lost compared to untreated material for the effect of autoclave and incubation or compared to the Control (CTL) for the effect of F1 and F2.

		Total mass loss (%)	cellulose loss (%)	hémicellulose loss (%)	lignin loss (%)	Water-soluble fraction loss (%)	Ethanol-soluble fraction loss (%)
Hazel_1mm	A	0.3 ± 0.2	2.0 ± 0.4	0.5 ± 0.3	-5.4 ± 0.6	-0.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	CTL	2.0 ± 1.5	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.2	-1.6 ± 0.1	-1.4 ± 0.7	0.6 ± 0.0
	F1	8.4 ± 0.1	0.4 ± 0.5	1.7 ± 0.4	4.2 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.1
	F2	10.5 ± 0.1	0.0 ± 1.0	1.3 ± 0.3	5.2 ± 1.0	-1.2 ± 0.4	0.4 ± 0.1
Hazel_4mm	A	-0.7 ± 0.3	1.8 ± 1.6	0.7 ± 0.7	-4.0 ± 3.4	-1.0 ± 0.9	0.2 ± 0.2
	CTL	2.1 ± 1.6	2.0 ± 0.0	-0.3 ± 0.0	-5.3 ± 0.0	-1.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0
	F1	8.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.5 ± 1.0	5.0 ± 1.2	-0.2 ± 0.3	0.6 ± 0.0

	F2	9.7 ± 0.3	2.0 ± 2.0	3.2 ± 2.6	6.1 ± 2.4	-1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0
Acacia_1mm	A	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.5	-1.3 ± 0.1	-5.1 ± 0.4	-1.5 ± 0.0	-0.1 ± 0.0
	CTL	1.5 ± 0.1	-0.5 ± 0.8	0.4 ± 1.0	-2.1 ± 0.5	-1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	F1	11.9 ± 0.3	5.7 ± 0.8	0.8 ± 0.2	-0.9 ± 0.3	3.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1
	F2	7.5 ± 0.2	3.2 ± 1.7	1.4 ± 1.6	0.9 ± 0.8	2.7 ± 0.4	-0.1 ± 0.1
Acacia_4mm	A	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.3	-2.4 ± 0.2	-5.0 ± 0.6	-2.3 ± 0.4	0.7 ± 0.1
	CTL	2.3 ± 1.2	0.1 ± 0.3	-1.7 ± 0.1	-4.6 ± 0.2	-3.7 ± 0.1	1.2 ± 0.0
	F1	12.2 ± 0.1	5.7 ± 0.5	0.9 ± 0.6	0.7 ± 0.3	4.5 ± 0.6	0.3 ± 0.4
	F2	8.5 ± 0.5	2.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.4 ± 0.9	3.1 ± 0.2	0.7 ± 0.0
Barley straw_1mm	A	2.0 ± 0.2	3.4 ± 0.2	2.9 ± 0.2	-1.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1	-0.7 ± 0.1
	CTL	2.6 ± 0.2	3.9 ± 0.1	7.8 ± 0.1	-2.4 ± 0.1	1.9 ± 0.5	0.2 ± 0.1
	F1	5.5 ± 0.2	3.5 ± 0.5	0.6 ± 0.6	-0.4 ± 1.5	-0.6 ± 0.3	-0.1 ± 0.1
	F2	-1.6 ± 0.2	0.0 ± 0.3	-1.7 ± 0.3	-1.5 ± 0.7	-0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Barley straw_4mm	A	1.2 ± 0.1	3.4 ± 0.6	3.4 ± 0.5	-2.4 ± 0.4	0.8 ± 0.1	-0.2 ± 0.0
	CTL	1.1 ± 0.2	2.9 ± 0.0	5.6 ± 0.0	-0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.0	-0.2 ± 0.0
	F1	-0.9 ± 0.6	0.1 ± 0.3	-0.5 ± 0.2	-0.6 ± 0.1	-0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.1
	F2	-0.6 ± 1.3	-0.1 ± 0.1	-0.3 ± 0.1	-0.5 ± 0.3	-0.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Wheat straw_1mm	A	1.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	-2.4 ± 0.1	-0.9 ± 0.5	-1.0 ± 0.4	-0.2 ± 0.1
	CTL	6.1 ± 1.5	9.9 ± 0.2	10.4 ± 0.1	-3.1 ± 0.1	-1.7 ± 0.3	0.3 ± 0.3
	F1	3.4 ± 0.8	-4.0 ± 0.3	-9.5 ± 0.4	4.6 ± 0.7	-0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1
	F2	0.7 ± 0.0	-5.9 ± 1.0	-10.5 ± 0.0	4.1 ± 0.8	-0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.0

Wheat straw_4mm	A	1.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.3 ± 1.0	-1.2 ± 0.4	-2.0 ± 0.1	0.5 ± 0.0
	CTL	4.5 ± 1.1	4.0 ± 0.0	2.2 ± 0.0	-1.5 ± 0.0	-2.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
	F1	0.1 ± 0.3	-0.4 ± 1.1	-1.6 ± 0.5	0.4 ± 0.7	-0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0
	F2	0.4 ± 1.1	-0.3 ± 0.8	-1.3 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.7 ± 1.0	-0.3 ± 0.7
Bagasse_1mm	A	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.3	0.7 ± 0.5	-3.5 ± 0.3	-1.8 ± 0.3
	CTL	5.0 ± 0.7	0.9 ± 0.5	-0.8 ± 2.3	3.3 ± 0.4	-1.5 ± 0.3	-0.6 ± 0.3
	F1	15.3 ± 0.5	-2.2 ± 0.1	5.7 ± 0.5	5.4 ± 0.2	5.6 ± 0.2	-0.2 ± 0.3
	F2	11.6 ± 0.3	-3.1 ± 0.1	5.5 ± 0.1	5.3 ± 0.2	4.2 ± 0.5	0.5 ± 0.3

Autoclaving the 5 materials induces a relatively low loss of the overall mass (Suppl. Table 1), not exceeding 3.1% of the initial total solid (TSi). By contrast modifications are evidenced in the materials with some organic matter formerly analyzed as (hemi)-cellulose that would be extracted in water or ethanol after thermal treatment in autoclave or that would react with other compounds to form some lignin-like molecules assayed by the protocol thereof. Indeed, the amount of aqueous extractable compounds after autoclave treatment increased by several tens of % (in absolute 1 to 3% of the TSi) with higher increase for the larger 4 mm-particles than for the 1 mm particles. Soluble compounds released through Maillard reactions for example, between carbohydrates and nitrogen compounds, and micropores swelling promoting the diffusion of these and other molecules initially present are discussed. Maillard reactions would lead to a loss of about 10 to 25% of the apparent mass of cellulose and hemi-cellulose in samples Hazel, Barley straw and Bagasse, *i.e.* up to 6% of the TSi, whereas, in the case of Acacia and Wheat straw, a loss of about 2 to 7% of cellulose was observed and an apparent gain between 10 and 21% of hemi-celluloses. This may suggest that after thermal treatment of Acacia and Wheat straw, the hemi-celluloses would be less degraded through acid hydrolysis. However, while the impact of autoclaving is relatively lower on (hemi-) cellulosic fractions from samples Acacia and Hazel than those from bagasse or straw materials, it is balanced at a two to a four-fold higher level by additional lignin-like compounds and/or aqueous extractives. This “higher level compounds” phenomenon could partly be due to some (hemi-) cellulosic compounds fusing to other compounds (initially insoluble in water nor reacting to lignin assay method) by reactions catalyzed by the autoclaving treatment. Regarding the straw samples, the increase of reactive compounds to the lignin assay protocol does not allow to take into account more than half of the carbohydrates loss. These carbohydrates and any other compounds formed by reaction with nitrogen-containing compounds from straw would be released in aqueous and ethanol extractives. Regarding the lignin and (hemi-)

celluloses losses from Bagasse, reaching about 1% and 6% respectively of TSi, they are balanced by an equivalent increase of extractable substances with water or ethanol. These "moves" of carbohydrate materials from Bagasse biomass to soluble compounds are easily understandable assuming that some sucrose molecules would be trapped in the cellulose fibers and identified as such by error due to the non-segregating analytical method. Indeed, after the autoclave treatment that promotes diffusion of these sugars to the ends of the fibers, they become easily extractable by the aqueous solvent. Moreover, the results on the five fractions assayed within Bagasse indicates that other non-assayed molecules such as proteins non-soluble in water or alcohol were allowed to react with some molecules, such as hemi-celluloses, and thus modify their characteristics during the acid hydrolysis process at a higher level comparing to pure molecules (controls). Steam explosion is similar to autoclaving but at higher temperature. Some results of lignin increases have been reported for different steam explosion conditions (Ballesteros et al., 2004; Bauer et al., 2014; Vivekanand et al., 2013). The reason for the increase of lignin could also probably be attributed to the formation of pseudo-lignin (Sannigrahi et al., 2011; Vivekanand et al., 2013). Incubation after autoclaving generally leads to an increase in total material loss and, particularly, regarding the loss of ethanol extractive for Acacia and Hazel. A significant reduction in loss of (hemi-) celluloses for these samples and bagasse is also observed. However, some kind of pore "retraction" is suggested in a few materials containing soluble molecules in water or ethanol. Additionally aqueous autohydrolysis phenomena of (hemi-) celluloses compounds might explain the behavior of straw samples during incubation. These results should be related with the increase of lignin-like compounds.

References

1. Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.*, 39(12), 1843-1848.
2. Bauer, A., Lizasoain, J., Theuretzbacher, F., Agger, J.W., Rincón, M., Menardo, S., Saylor, M.K., Enguédanos, R., Nielsen, P.J., Potthast, A., Zweckmair, T., Gronauer, A., Horn, S.J. 2014. Steam explosion pretreatment for enhancing biogas production of late harvested hay. *Bioresour. Technol.*, 166(0), 403-410.
3. Rodriguez, C., Hilgsmann, S., Ongena, M., Charlier, R., Thonart, P. 2005. Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation*, 16(5), 415-422.
4. Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A. 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energ. Environ. Sci.*, 4(4), 1306-1310.

5. Vivekanand, V., Olsen, E.F., Eijssink, V.G.H., Horn, S.J. 2013. Effect of different steam explosion conditions on methane potential and enzymatic saccharification of birch. *Bioresour. Technol.*, 127(0), 343-349.

VIII.7.2. Effect of sulfuric acid hydrolysis and autoclave sterilization on different carbohydrates

Suppl. Table 2. Effect (measured as % of denaturation) of sulfuric acid hydrolysis (72% at room temperature or 4% at 121°C for an hour) and autoclave sterilization on different carbohydrates : glucose and xylose; pure xylan with or without presence of different nitrogen sources (xylan from beechwood (Roth 064 206 494), birchwood (Sigma X0502) or oat spelts (Sigma X0627 containing traces of glucose or arabinose). (- means not tested).

			Autoclave 121°C		Autoclave + 4% Acid 121°C	
	72% Acid	4% Acid	AA or peptone	Yeast or Beef extract	AA or peptone	Yeast or Beef extract
	RT	121°C				
Glucose	18 ± 6	18 ± 3	3 ± 3	7 ± 1	20 ± 2	20 ± 6
Xylose	19 ± 14	33 ± 5	-	-	-	-
Xylan birchwood	from 57 ± 4	50 ± 2	-	-	-	-
Xylan beechwood	from 57 ± 2	-	0 ± 0	0 ± 0	59 ± 2	-
Xylan oat spelts	from 55 ± 7	-	0 ± 0	0 ± 0	70 ± 7	-

Note that the sum of the contents of these five fractions of organic compounds (Table 1) does not reach 100% of the total mass of the initial samples: this is partly due to the analytical method for (hemi-) cellulose content that is more accurate for the materials rich in cellulose (wood, cardboard, paper, ...) than for those rich in hemicelluloses, as suggested in the literature (Zeitoun et al., 2010). Indeed, the two-step acid hydrolysis (72% sulfuric acid treatment followed by 4% sulfuric acid treatment at 121 ° C) degrades 18±6% of the glucose that could be released during hydrolysis and 19±14% of xylose (Suppl. Table 2). By contrast, the second hydrolysis step conducted directly (without contact of the molecules with the concentrated acid) on glucose or xylose (5 g/L in 4%

sulfuric acid solution) degraded with lower deviation (on up to 9 replicates at different times) about $18\pm3\%$ and $33\pm5\%$, respectively. In addition, acid hydrolysis carried out in two steps or only through the second step on pure hemicelluloses lead to the degradation of 50% to about 60% (Suppl. Table 2) of the compounds tested. Denaturation is further increased by 5 to 30% (Suppl. Table 2) when autoclaving the pure hemicelluloses in presence of additional glycine or peptone before acid hydrolysis (4% sulfuric acid). These results highlight the high reactivity of the sole hemicelluloses.

References

1. Zeitoun, R., Pontalier, P.Y., Marechal, P., Rigal, L. 2010. Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: influence on extract purity and purification performance. *Bioresour. Technol.*, 101(23), 9348-9354.

Suppl. Table 3.

Suppl. Table 3. Enzymatic (hemi-)cellulose digestibility results. Data reported as mean \pm S.D. of three measurements and based on total solid of sample.

		%Digestibility		
		Cellulose	Hemicellulose	Total
Hazel_1mm	UT	4.5	2.5	7.0 \pm 0.1
	A	5.0	2.6	7.6 \pm 0.1
	CTL	4.4	2.3	6.8 \pm 0.1
	F1	11.3	4.6	16.0 \pm 0.1
	F2	15.3	6.1	21.4 \pm 0.4
Hazel_4mm	UT	4.1	2.1	6.1 \pm 0.1
	A	5.0	1.9	6.8 \pm 0.1
	CTL	4.6	1.9	6.4 \pm 0.4
	F1	11.8	4.8	16.6 \pm 0.6
	F2	14.4	5.3	18.6 \pm 0.2
Acacia_1mm	UT	12.4	3.2	15.7 \pm 0.3
	F2	6.9	2.5	9.4 \pm 0.0
Acacia_4mm	UT	10.3	3.0	13.3 \pm 0.1
	F2	6.4	2.3	8.6 \pm 0.2
Barley straw_1mm	UT	8.4	5.1	13.5 \pm 0.0
	F2	11.4	7.3	18.7 \pm 0.0
Barley straw_4mm	UT	9.1	5.8	14.9 \pm 0.3
	F2	11.6	7.3	18.9 \pm 0.3
Bagasse_1mm	UT	10.4	10.3	20.7 \pm 0.2
	F2	18.2	15.7	33.9 \pm 0.2

IX. Fungal pretreatment effects on chemical and structural characteristics of lignocellulosic biomass pretreated with *Ceriporiopsis subvermispora*

R. Bayard*, X. Liu, C. de Brauer, H. Benbelkacem, R. Gourdon.

Université de Lyon, INSA-Lyon, Laboratoire LGCIE-DEEP, Bât. S. Carnot, 9 rue de la Physique, F-69621 VILLEURBANNE, France.

* Corresponding author. Tel.: +33 472 438 753; fax: +33 472 438 717.

E-mail address: remy.bayard@insa-lyon.fr

Article soumis au Journal Bioresource Technology en novembre 2015

Highlights

The results of structural analysis are consistent with the chemical compositional results.

The structural analysis revealed that the effects of fungal pretreatment depend on the type of lignocellulosic biomass.

The structural analysis showed that two strains of *C. subvermispora* exhibited different metabolisms even on the same lignocellulosic biomass.

Lignin content has a negative correlation with k significantly, with BMP and ECD in a lower extent.

IX.1. Abstract

The effects of fungal pretreatment of five lignocellulosic biomasses (Hazel, Acacia, Barley straw, Wheat straw and Sugarcane bagasse) by two strains of *Ceriporiopsis subvermispora* (ATCC 90467 and ATCC 96608) on chemical and structural characteristics were investigated. Results indicated that *C. subvermispora* preferentially degraded lignin over holocellulose in Hazel and Bagasse. The results of FTIR and TG-DSC analyses concluded that fungal pretreatment could break down the linkages in the structure of lignocellulosic biomass, which is consistent with the chemical compositional results. It is proposed that the effects of fungal pretreatment depend on the type of lignocellulosic biomass. Moreover, two strains of *C. subvermispora* showed different metabolisms even on the same lignocellulosic biomass.

Keyword: fungal pretreatment, biomethane potential, lignocellulosic biomass, biochemical analyses, structural analysis, *Ceriporopsis subvermispora*.

IX.2. Introduction

Lignocellulosic biomass provides an abundant renewable resource for production of biofuels (*i.e.* bioethanol, biodiesel, biogas, bio-oil...) (Monlau et al., 2015; Ragauskas et al., 2006). It can contribute significantly to the future global energy supply without competition with increasing food demand for existing arable land (Jonsson et al., 2013; Metzger & Hüttermann, 2009). Among biofuels, the production of biogas through anaerobic digestion (AD) of lignocellulosic biomass exhibits more advantages compared to other biological processes (*i.e.* biodiesel, bioethanol and biohydrogen fermentation), which is mainly due to its simplicity and capacity to process a wide range of substrates (Monlau et al., 2015).

Lignocellulosic biomass presents a major problem for biomethane production on account of its complex structure that limits its biodegradability (Monlau et al., 2013). Cellulose, hemicellulose and lignin are the main components of lignocellulose, and lignin protects cellulose and hemicelluloses. Lignin is composed of Syringyl (S), guaiacyl (G), and *p*-hydroxyphenyl (H) units in different proportions (Sipponen et al., 2013). Moreover, lignin is highly recalcitrant to degradation due to its aromatic nature and structural heterogeneity (Barrasa et al., 2014). Thus, the pretreatments are required to overcome the barriers and further improve the biomethane production of lignocellulosic biomass (Krishania et al., 2013). Among different pretreatment methods of lignocellulosic biomass, fungal pretreatment is attractive as it is an environmentally friendly process (Shi et al., 2012; Wan & Li, 2012; Zhao et al., 2014). Among various types of fungi, white-rot fungi remove lignin to gain access to cell wall carbohydrates for carbon and energy sources (Fernandez-Fueyo et al., 2012). There are two types of white-rot decay: the simultaneous degradation of cellulose, hemicellulose and lignin and the selective degradation of the lignin (Tanaka et al., 2009). *Ceriporiopsis subvermispora*, a selective white-rot fungus, has the ability to remove lignin in advance of cellulose (Fernandez-Fueyo et al., 2012) and is considered as one of the best examples of a selective lignin degrader (Akhtar et al., 1993; Blanchette et al., 1997; Tanaka et al., 2009).

Alterations in chemical composition and structural characteristics of lignocellulosic biomass occur during white-rot fungal pretreatment (Blanchette et al., 1997; Dorado et al., 1999; Pandey & Pitman, 2003; Taniguchi et al., 2005). Several studies have already investigated for various biomasses the relationships between biomethane production and chemical composition of various biomasses, in particular lignin content. Moreover, an inverse linear correlation was obtained between the methane yield and the lignin content (Bayard et al., 2015; Liew et al., 2012; Triolo et al., 2012).

On the other hand, the structure of lignocellulosic biomass was widely characterized by using infrared spectroscopic analysis. And also, thermal analysis such as thermogravimetry (TG), differential thermogravimetry (DTG) and differential scanning calorimetry (DSC) could provide useful information of lignocellulosic structure (Caballero et al., 1997; Chen et al., 2010; Fernández et al.,

2012; Reh et al., 1986), and the stability of lignocellulosic compost (Dell'Abate et al., 1998; Smidt & Tintner, 2007) and biomass (Reh et al., 1987; Tsujiyama & Miyamori, 2000), which could be used to study the physicochemical changes of lignocellulose during pretreatment process (Zhang et al., 2014). Beech wood decayed by *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* has been studied and lignin determination accounted for a slightly preferential lignin degradation by the fungi. In addition, both the FTIR and thermal analysis revealed that the lignin moiety of the samples was modified more than the holocellulose part (Faix et al., 1991).

Correlations between the lignin content of spruce wood samples biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispora* and Mid infrared (MIR) and near infrared (NIR) spectra were used to estimate their delignification behavior in an early stage of degradation (Schwanninger et al., 2004). Fungal pretreatment of corn stover by three species of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* BP2, *Echinodontium taxodii* 2538 and *Irpex lacteus* CD2 has been studied and the structure analysis with FTIR indicated that fungal pretreatment could destroy the structure of lignin and decrease the crystallinity of cellulose in the corn stover (Yang et al., 2010). Chemical compositional analyses and multiscale visualization methods were used to elucidate the degradation process of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* and investigate the physicochemical changes that take place within the straw structure (Liu et al., 2014).

However, correlation between the anaerobic degradability of biomass and the compositional and structural properties remains unclear and contradictory. Fungal pretreatment of five lignocellulosic biomasses with two strains of *C. subvermispora* to improve methane fermentation has been recently investigated. Our results present that fungal pretreatment could improve anaerobic biodegradability and enzymatic cellulose digestibility of lignocellulosic biomass. In addition, it is suggested that the effects of fungal pretreatment depend on the type of lignocellulosic biomass and two strains of *C. subvermispora* showed different metabolisms even on the same lignocellulosic biomass.

The present work provides additional data for explaining lignocellulose biodegradation by *C. subvermispora* during solid-state fermentation of two forestry residues: Hazel and Acacia branches; and three agricultural residues: Barley straw, Wheat straw and Sugarcane Bagasse. The structural characteristics of lignocellulose samples were studied with complementary methods, including FTIR and TG-DSC analysis. Moreover, the correlation among biomethane production, chemical and structural characteristics was investigated by statistical methods.

IX.3. Materials and Methods

IX.3.1. Collection and preparation of biomass substrates

Two forest residue samples Hazel and Acacia branches were collected from private forest of Régný - Rhône-Alpes in France. Regarding three agricultural residue samples, Barley straw and Wheat straw

were obtained from private farm located in the region of from Picardie, in France, and sugarcane Bagasse was obtained from Artisanal distillery in Plaine de Cul-de-Sac, Port-au-Prince, Haiti. All the samples collected, about 10 kg each, were homogenized and transported to the laboratory. The samples were firstly dried in an oven at 60°C for 3 days, and then were shredded three times with a low-speed shredder Blik® monorotor M420 and then sieved down to 10 mm, to obtain homogenous solid samples. Afterwards, two shredding in a cutting mill Retsch® SM 200 were carried for crushing again to pass through a 4 mm mesh, and finally 1 mm mesh. All the analyses were performed in triplicates, using the same dried and crushed samples. Samples were stored at 2°C until they were used.

IX.3.2. Fungi, inoculum preparation and solid-state fermentation of biomass

Ceriporiopsis subvermispora (ATCC 90467 named F1) and *Ceriporiopsis subvermispora* (ATCC 96608 named F2) cultures were stored on 33.6 g L⁻¹ malt extract agar plates at 4°C. The two strains were cultured on 33.6 g L⁻¹ malt extract agar for 7 days at 28°C. Ten discs (10 mm in diameter) of the agar plug of each strain were transferred to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of 33.6 g L⁻¹ malt-extract medium and incubated unshaken at 28°C for 7 days. Each liquid culture was aseptically blended in three cycles of 15 s and then each mycelium suspension was used for inoculation (Wan & Li, 2010).

The pretreatment of biomass by solid-state fermentation were carried out in 250 ml Erlenmeyer flask containing 10 g samples and 30 ml distilled water. Samples mixed water were firstly autoclaved at 121°C for 30 min, and then were loaded with F1 or F2 liquid culture after being cooled to room temperature. 2 ml liquid culture was added in the flasks. 2 ml sterile water was added in control flasks. The control flasks without fungal inoculation were set along with the fungal pretreatment flasks (Wan & Li, 2010). All flasks were incubated at 28°C for 28 d. The control and pretreatment flasks were dried at 60°C for 72 h after the incubation. The control and pretreatment flasks were performed in duplicate and triplicate, respectively.

Moreover, autoclaved samples were also prepared to investigate the effect of sterilization by autoclaving on the biochemical contents. Autoclaved samples were samples mixed with distilled water with a weight ratio of 10:30 (sample : water) undergoing the autoclaving process at 121°C for 30 min. Afterwards, the flasks containing autoclaved samples were dried at 60°C for 72 h. The autoclaved flasks were performed in triplicate.

IX.3.3. Biochemical analysis

The samples were extracted successively with HPLC grade water and with a volume fraction of 99.9% ethanol using the Dionex ASE 350 system following NREL Laboratory Analytical Procedure (Sluiter et al., 2005). Extractives free samples were used to determine cellulose, hemicellulose and lignin by according to NREL Laboratory Analytical Procedure (Sluiter et al., 2008). The samples were hydrolyzed with a mass fraction of 72% sulphuric acid at 30°C for 1 h. The acid was diluted to a final mass fraction of concentration of 4% with the addition of 84 mL water, and the mixture was autoclaved at 121°C for 1 h. The residue was cooled and filtered. The acid insoluble residue was dried at 105°C overnight, after which it was placed in a furnace at 575°C for 24 h. The difference between the weight of dried solids and that of the ash was determined as acid insoluble lignin. Acid soluble lignin was determined by measuring the UV absorption of the acid hydrolysis supernatant at 205 nm. Monomeric sugars (glucose, xylose, galactose, arabinose and mannose) were measured with a HPLC Waters® equipped with Bio-Rad Aminex HPX-87P column and refractive index detector (RID) at 85°C and 49°C, with HPLC grade water as the mobile phase, eluting at 0.6 mL min⁻¹. Cellulose and hemicellulose concentrations were calculated from the corresponding monomers.

IX.3.4. Organic matter content

Volatile solid (VS) was quantified on solid samples according to the Standard method ISO 11465 (ISO, 1994).

IX.3.5. Biochemical methane potentials (BMP)

BMP were determined following the method described by Liu et al. (Liu et al., 2015). Inoculation was provided by the addition of an anaerobic sludge on the basis of 2 g of inoculum volatile solids for each gram of substrate volatile solid. Substrates in the form of fine powders (1 mm) were suspended in 200 mL of nutrient medium prepared according to the standard procedure ISO 11734 (ISO, 1998), and 100 mL of inoculum suspension in 500 mL serum bottles. The bottles were incubated for 45 days at 35 ± 2°C in the dark. Biogas production was monitored using a Digitron® 2085P pressure transducer. Gas composition was periodically analyzed with an Agilent® gas micro-chromatograph. BMP was expressed in L of CH₄ per kg of VS at 0°C and 10⁵ Pa. Experimental data of cumulative total methane production was tested on first order kinetics:

$$V(t) = V_{\max} (1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

where $V(t)$ was the cumulative methane production reached at time t , V_{\max} ($L_{CH_4} \cdot kg_{VS}^{-1}$) the ultimate methane production potential, and k the first order kinetic constant (d^{-1}) of biodegradation.

The best fit values of the parameters were determined by applying a least squares fit of the above equations to each data set using Microsoft Excel's solver function. Ultimate anaerobic potentials used for regressions were calculated from the average of the last two points of cumulative production data.

IX.3.6. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was carried out following the NREL procedure (Selig et al., 2008). The samples were diluted to 15 g L⁻¹ in a 12.9 g L⁻¹ sodium citrate buffer (pH 4.8). The cellulase (Sigma-Aldrich) and the β -glucosidase (Sigma-Aldrich) loadings were 60 FPU g⁻¹cellulose and 64 ρ NPGUg⁻¹cellulose, respectively. Hydrolysis experiments were conducted in a shaking water bath at 150 r min⁻¹ and 50°C. After 168 h, the reaction was terminated by transferring the mixture to boiling water for 5 min to deactivate the enzymes. The supernatant of each sample was filtered through 0.22 μ m filters. The soluble glucose in the enzymatic hydrolysate was measured by HPLC Waters® using a Bio-Rad HPX-87H column and refractive index detector (RID) that were maintained at 45°C and 30°C, respectively. 0.49 g·L⁻¹ H₂SO₄ was used as the mobile phase, eluting at 0.6 mL min⁻¹. The percent digestibility of the cellulose was determined as follows:

$$\% \text{ Enzymatic cellulose degradation (ECD \%}_{Cell}) = \frac{\text{cellulose digested (g)}}{\text{cellulose added (g)}} \times 100 \quad (2)$$

IX.3.7. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra were recorded with a NICOLET iS50 FT-IR spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Madison WI). KBr pellets for FTIR spectroscopy were prepared (3 mg of cryo-crushed sample in 200 mg of KBr) (Pandey & Pitman, 2003). Absorbance spectra were acquired between 400 and 4000 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹. OMNIC software (Nicolet instrument) was used for data acquisition and post-treatment. Band assignments are given in Table 1. The syringyl/guaiacyl (S/G) ratio was calculated as the 1320 to 1269 peak ratio (Li & McDonald, 2014; Malutan et al., 2007; Pandey & Pitman, 2003). Total Crystallinity Index (TCI), calculated as the 1375 to 2900 cm⁻¹ peak ratio (Di Girolamo et al., 2014; Nelson & O'Connor, 1964), which reflects the overall degree of order of cellulose; Lateral Order Index (LOI), calculated as the 1430 to 898 cm⁻¹ peak ratio (Di Girolamo et al., 2014; Hurtubise & Krassig, 1960), indicating the amount of crystalline vs. amorphous cellulose (*i.e.*, their ratio). Depending on LOI and cellulose, the amount of crystalline may be calculated as (Monlau et al., 2012):

$$\text{Crystalline cellulose (\% of TS)} = \text{cellulose (\% of TS)} \times \left(\frac{LOI}{1+LOI} \right) \quad (3)$$

Table 1. Assignments of bands in FTIR spectra of fiber fractions.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignments		Reference
2900	C-H stretch	Cellulose	(Di Girolamo et al., 2014; Gastaldi et al., 1998)
1740	C=O stretch	Hemicellulose	(Heitner et al., 2010; Pandey & Pitman, 2003)
1643	Ring conjugated C=C stretch of coniferyl/sinapyl alcohol	Lignin	(Heitner et al., 2010)
1600	C=C stretch of aromatic ring	Lignin	(Di Girolamo et al., 2014; Heitner et al., 2010)
1506	Aryl ring stretch	Lignin	(Heitner et al., 2010)
1460	C-H deformation	Lignin	(Heitner et al., 2010; Pandey & Pitman, 2003)
1430	-CH ₂ bending	Cellulose	(Di Girolamo et al., 2014; Liang & Marchessault, 1959)
1375	C-H deformation in cellulose and hemicellulose	Cellulose and hemicellulose	(Pandey & Pitman, 2003)
1320	Aryl ring breathing with C-O stretch	Syringyl derivatives	(Fengel & Wegener, 1983;

			Rana et al., 2010)
1269	Aryl ring breathing with C=O stretch	Guaiacyl lignin	(Heitner et al., 2010; Malutan et al., 2008)
1160	C-O-C vibration	Cellulose and hemicellulose	(Pandey & Pitman, 2003)
1050	C-O stretch	Cellulose and hemicellulose	(Pandey & Pitman, 2003)
898	Glucose ring stretch, C-H deformation	Cellulose	(Di Girolamo et al., 2014; Stewart et al., 1995)

IX.3.8. Thermal analyses

Thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) has been proposed in this study as informative and low cost method to characterize biomass. A Setaram LABSYS TG DSC 1600 thermal analyzer was used for TG/DSC analysis. This apparatus allowed to record, as a function of temperature, both the mass sample evolution (TG), and the heat flow variation between the sample and a reference (DSC). A cryo-crushed sample weight of 10.4 ± 0.1 mg was placed in an open alumina crucible. A carrier gas (air) was passed through the system at 1.8 L h^{-1} while the sample was heated at $10^\circ\text{C min}^{-1}$ from 25°C up to 850°C . The temperature of the sample and reference were recorded by a platinum/rhodium thermocouple (type S), and a high-precision balance registered the weight change due to physical or chemical alterations of the sample (Achour, 2008). Thermal analyses were repeated three times to test samples homogeneity and also the reproducibility of the instrument.

IX.3.9. Statistical analysis of experimental data

Analytical data were firstly treated by principal component analysis (PCA) to identify the multiple correlations between the variables on the one hand, the substrates on the other. PCA is a multivariate statistical data reduction technique where the new variables (principal components or factors) are calculated from linear combinations of the original variables. The principal components are orthogonal to each other to avoid any redundant information. The first principal component, or factor, accounts for the greatest variability in the data. PCA calculations were carried out with Xlstat software. Then, 2

by 2 correlations were studied between the results of anaerobic biodegradation BMP and specific variables using linear regression evaluations.

IX.4. Results and discussion

IX.4.1. Determination of biochemical components of five biomasses

Lignin content of Hazel (19.9%) was the highest among the five untreated biomasses, followed by Acacia and Bagasse with 15.3%, as for Barley and Wheat straw, 13.1% lignin were observed. The content of cellulose and hemicellulose of the five biomasses varied from 29.7 to 35.4% and from 11.6 to 28.7%, respectively. Regarding extractives content, water extractives content were much more than those of ethanol extractives. 4.8 to 8.1% water extractives content were observed in all biomasses except Bagasse with 23.7%, however, ethanol extractives were similar among all the five biomasses with a range of 2.6 to 3.8%.

The lignin content of Wheat straw and wood samples in this study were less than those reported in Wan and Li (Wan & Li, 2011), in which the lignin content were 20.91% and 21.6% for Wheat straw and Hardwood, respectively. On the other hand, the holocellulose content of Wheat straw was similar to our results with 33.48% cellulose and 22.62% hemicellulose, however, Hardwood disposes more holocellulose than those of the two forest lignocellulosic biomasses Hazel and Acacia in this study. The average of 16 wood cutting samples reported in Triolo et al. showed more lignin content with 22.5% and less cellulose content with 22.4% (Triolo et al., 2012). Compositions of Barley straw in this study were similar to the range reported in Rowell (Rowell, 1992) and Sanchez (Sanchez, 2009) with 14-15% lignin, 24-29% hemicellulose and 31-34% cellulose. However, Barley straw studied in Dinuccio was much more rich in holocellulose with 46.8% cellulose and 30% hemicellulose and less recalcitrant with 9.6% lignin (Dinuccio et al., 2010). The components of biomasses vary among different types of biomass, and furthermore the components of different origins vary even for the same type biomass (Ding & Himmel, 2006; Gandolfi et al., 2013; Zhang & Lynd, 2004).

After autoclave process, the extent of increase of lignin content varied from 8.4% for Wheat straw to 35.3% for Acacia. It is suggested that pseudo-lignin could be formed during autoclave process (Sannigrahi et al., 2011; Vivekanand et al., 2013). No significant changes of cellulose or hemicellulose content of autoclaved samples were observed compared to those of corresponding untreated sample. Fungal pretreatment of two strains both showed selective lignin degradation to some extent. The lignin content of Bagasse, Wheat straw and Hazel pretreated with F1 or F2 decreased by 34.4% or 30.5%, 24.0% or 23.4% and 13.7% or 12.8%, respectively, which resulted in the increase of cellulose content. Regarding Acacia and Barley straw, it seemed likely that F1 and F2 should prefer to degrade cellulose,

which could be due to their less recalcitrant structure and is consistent with the results of ECD (Table 2). Similar result was reported before. The type of degradation performed by white-rot fungi that can either remove all cell wall components or selectively remove only lignin or hemicellulose may result from substrate or environmental factors that influence fungal physiology (Blanchette et al., 1985).

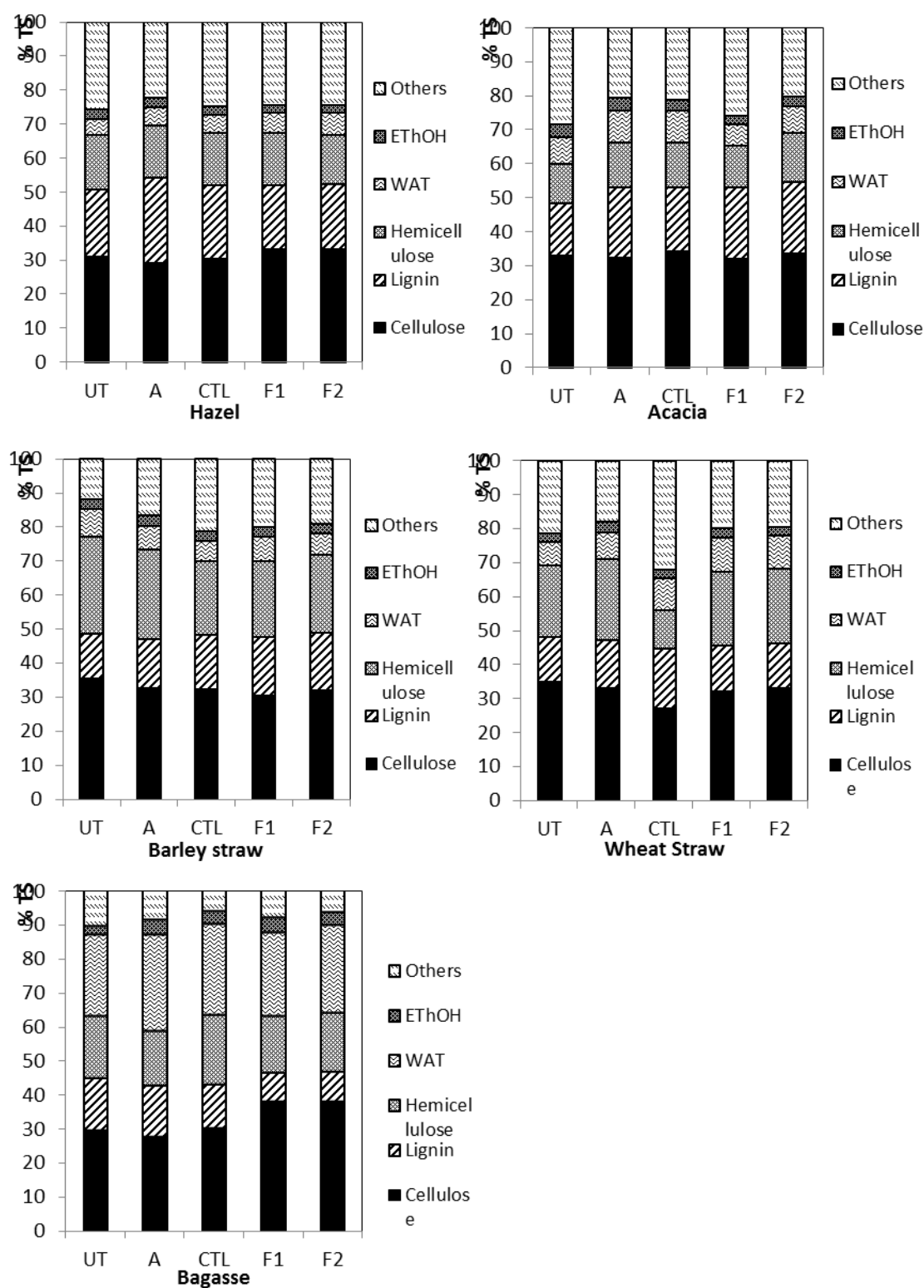


Figure 1: Composition of components of the five different lignocellulosic biomasses

Table 2. ECD, BMP and kinetic rates of all the samples. Data reported as mean \pm standard deviation on triplicates.

Sample	ECD (% Cell)	BMP ($L \cdot kg_{VS}^{-1}$)	k (d^{-1})
Hazel			
UT	8.8 ± 0.5	99.6 ± 1.7	0.049
A	11.4 ± 0.1	112.7 ± 0.3	0.048
CTL	10.7 ± 1.1	105.8 ± 4.3	0.042
F1	29.9 ± 1.0	161.7 ± 18.4	0.070
F2	47.1 ± 1.5	209 ± 18.1	0.084
Acacia			
UT	22.8 ± 0.8	155.5 ± 2.5	0.107
A	28.3 ± 0.2	172.5 ± 18.8	0.100
CTL	26.1 ± 2.5	170.5 ± 8.3	0.088
F1	7.1 ± 0.8	112 ± 9.2	0.041
F2	18.6 ± 0.4	179.8 ± 5	0.054
Barley straw			
UT	19.7 ± 1.3	273.9 ± 1.5	0.087
A	27.4 ± 1.7	257.2 ± 16.2	0.125
CTL	27.8 ± 1.5	258.5 ± 14.2	0.121
F1	17.8 ± 0.2	247.7 ± 10.5	0.093
F2	31 ± 0.3	228.7 ± 20	0.124
Wheat straw			
UT	20.3 ± 0.2	331.1 ± 22.6	0.095
A	25.4 ± 1.0	269.8 ± 6.2	0.104
CTL	31.8 ± 2.7	271.1 ± 10.4	0.111
F1	24.8 ± 5.4	251 ± 1.2	0.086

F2	24.2 ± 0.2	263.1 ± 8.5	0.108
Bagasse			
UT	11.7 ± 2.0	247.7 ± 4.7	0.114
A	18.4 ± 0.2	225.4 ± 34.1	0.183
CTL	32.2 ± 3.3	242.2 ± 3.4	0.160
F1	67.0 ± 1.8	255.4 ± 8.7	0.202
F2	61.1 ± 1.9	251.3 ± 9.4	0.208

IX.4.2. FTIR

As can be seen in Fig. 2, a distinct difference among the spectra of the five untreated biomasses is that two peaks at 1630 cm⁻¹ and 1600 cm⁻¹ (lignin) were observed in Bagasse, however, one large band in the range from 1640 to 1600 cm⁻¹ in the four other biomasses were seen. The band at 1460 cm⁻¹ (lignin) in Barley straw, Wheat straw and Bagasse were less sharp compared to that of the three other biomasses. Moreover, the band at 1320 cm⁻¹ of two forest biomasses were more evident compared to those of the three other, which suggested that Hazel and Acacia should contain S-rich lignin, which is consistent with the results of thioacidolysis (data not shown). Regarding S/G ratio, the results determined by thioacidolysis of untreated Hazel, Acacia, Barley straw and Bagasse were 2.26, 1.50, 0.87 and 1.04, respectively, whereas the results measured by the intensities of 1320/1269 cm⁻¹ were 0.97, 1.02, 0.97 and 0.94, respectively. The thioacidolysis method is based on the lignin units only involved in β -O-4 bonds (Lapierre et al., 1995), however, FTIR examines the complete sample (Li & McDonald, 2014). The differences of S/G ratio results among methods were also found earlier (Li & McDonald, 2014).

The FTIR spectra of all the samples (UT, A, CTL, F1 and F2) of the five biomasses are presented in Fig. 3. Regarding each biomass, the spectra of its five samples (UT, A, CTL, F1 and F2) showed similar profiles but with the increase and/or decrease of intensities of certain bands. It is seen that the intensities of the bands at 1640 cm⁻¹ and 1600 cm⁻¹ of untreated Hazel are close, the same case for autoclaved and control samples of Hazel. Similar results could be seen for Barley straw and Bagasse. Regarding Acacia, the intensity at 1600cm⁻¹ of the control sample is lower than that at 1640 cm⁻¹. However, as for autoclaved and the control sample of Wheat straw, the intensities at 1600 cm⁻¹ are higher than those of 1640cm⁻¹. After fungal pretreatment, as for Bagasse, the bands at 1630 and 1600 cm⁻¹ of F1 and F2 pretreated Bagasse were much weaker than those of untreated, autoclaved and the control sample of Bagasse. Regarding Hazel and Acacia, it seems likely that the band at 1600 cm⁻¹ of

fungus pretreated samples decreased whatever the presence of F1 or F2. However, as for the two straw biomasses, the effect of F1 pretreatment seemed to increase the band at 1640 cm^{-1} . The increasing intensity of the 1640 cm^{-1} band and the decreasing intensity of 1600 cm^{-1} band could suggest that a structural change and a loss of aromatic units occurred during fungus degradation (Faix et al., 1991).

On the other hand, regarding Barley straw and Bagasse, no significant changes of the band at 1506 cm^{-1} could be seen among untreated, autoclaved, and the control sample. However, as for Hazel, a slight decrease of the band at 1506 cm^{-1} can be seen in the spectra of autoclaved and the control Hazel compared to that of untreated sample. By contrast, regarding Wheat straw, it seems likely that a slight increase of the band at 1506 cm^{-1} of autoclaved and the control samples occurred. In the case of Acacia, this band did not change much in the spectra of autoclaved sample, while a slight increase for the control sample could be seen. Regarding the fungus pretreated samples, the significant reduction of the band at 1506 cm^{-1} of two fungus pretreated Bagasse samples (F1 and F2) could be observed. On the contrary, this band seemed to increase slightly in the spectra of fungus pretreated Acacia and Wheat straw compared to the corresponding untreated sample. No significant changes of the band at 1506 cm^{-1} could be seen for fungus pretreated Hazel and Barley straw.

For the band at 1460 cm^{-1} , it is noted that a significant decrease of this band was observed in the spectra of F2 pretreated Bagasse, but not for F1. Moreover, no significant changes of this band are seen for the four other biomasses.

Regarding the band at 1320 cm^{-1} , no significant changes were observed in the spectra of autoclaved and the control samples of the five biomasses compared to the corresponding untreated samples except for a slight increase for the control Acacia. After fungus pretreatment, the band at 1320 cm^{-1} increased significantly for Hazel and Acacia. As for the two straws, F1 pretreatment could both increase this band significantly, but not for F2. No significant changes of the band at 1320 cm^{-1} were observed for fungus pretreated Bagasse. Regarding S/G ratio measured by the intensities of $1320/1269\text{ cm}^{-1}$, slight changes were observed on the samples after different treatment process (A, CTL, F1 and F2) of the five biomasses. Both autoclave and incubation without fungi process slightly increased the ratios of Hazel, Barley straw and Bagasse samples (maximum 2.2%) compared to that of corresponding untreated sample. However, the S/G ratio of autoclaved Acacia decreased slightly (0.4%), while that of the control sample of Acacia has a modest increase (0.8%). As for Wheat straw, the S/G ratio of autoclaved sample was same as that of untreated sample, while the ratio of the control sample decreased by 1.2%. The S/G ratios of fungus pretreated samples of the five biomasses all increased compared to that of corresponding control sample with a minimum increase of 0.4% for F2 pretreated Wheat straw and a maximum increase of 4.0% for F1 pretreated Barley straw. Moreover, regarding each biomass, the extent of increase of F2 pretreated sample is slight lower than that of F1 pretreated sample. The trend of change of S/G ratio among the control and fungus pretreated samples of the five

biomasses could not demonstrate that white-rot fungi may prefer to degrade syringyl lignin (S) compared to guaiacyl lignin (G) reported before (Dong et al., 2013; Faix et al., 1991; Puentes et al., 2012). It is probably due to that *C. subvermispora* should not show a preferential S-lignin degradation in our study, or it is probably due to that the differences among analysis methods and only FTIR analysis should not be sufficient for determination of S/G ratio.

On the other hand, the profiles of the bands in the 1200-1000 cm^{-1} region of autoclaved and the control samples, mainly assigned to C-O linkages present in polysaccharides (Ferraz et al., 2000), varied widely among the five biomasses. For instance, the bands in the range from 1200-1000 cm^{-1} of untreated Hazel and Bagasse seemed to be sharper than those of corresponding autoclaved and control samples, while it is opposite for Wheat straw. Moreover, as for Acacia, the bands ranging from 1200-1000 cm^{-1} of the CTL sample seemed to be sharper than those of untreated and autoclaved Acacia.

The five ratios of the intensities (Table 3) could indicate the ratios of the cellulose and/or hemicellulose contents against lignin content. Regarding all the samples (UT, A, CTL, F1 and F2) of the five lignocellulosic biomass, the extent of the changes of the three ratios of the intensities of 1050/1506, 1160/1506 and 1375/1506 cm^{-1} among fungal pretreated samples and untreated samples were more significant compared to those of the intensities of 898/1506 and 1740/1506 cm^{-1} , which is possibly due to that the three ratios represent the sum of impact of cellulose and hemicellulose vs. lignin. These changes of ratios of intensities of fungal pretreated samples demonstrated that *C. Subvermispora* modified indeed the structure of lignocellulosic biomass.

After fungal treatment, the ratios of 898/1506 cm^{-1} of Hazel samples increased slightly. As for the four other ratios, their increases were more significant. The augmentation of ratios of intensities of Hazel pretreated by F1 or F2 compared to control sample could suggest that the oxidation of lignin by the two fungi were important, furthermore, it seemed that F2 was slightly more efficient than F1 in terms of degradation of lignin in Hazel. Likewise, the ratios of F2 pretreated Bagasse samples were significantly higher than those of F1 pretreated, even if the cellulose, hemicellulose and lignin contents of F1 pretreated and F2 pretreated Bagasse are similar. It is noted that fungal pretreated Bagasse have higher content of cellulose and less amount of lignin compared to the control samples of Bagasse, which demonstrated that the two fungi had significant selective degradation effect on Bagasse. Regarding Hazel, the level of reduction of lignin content was less than Bagasse.

In the case of Acacia, the increases of ratios of intensities of 1050/1506, 1160/1506 and 1375/1506 cm^{-1} in the control and fungal pretreated samples were observed comparing to untreated and autoclaved Acacia, moreover the extent of increase in F2 pretreated Acacia was slightly more than that of F1 pretreated Acacia. Therefore, it is suggested that the increase of ratios of intensities could be due to that fungal pretreatment could degrade holocellulose and release more aliphatic structures (El

Ouaquoudi et al., 2014). Regarding Barley straw, no significant change of five ratios was observed. In the case of Wheat straw, the ratios of intensities of CTL, F1 and F2 pretreated were similar, which were higher than those of untreated or autoclaved Wheat straw.

Similar results have been reported before. Dorado et al. (Dorado et al., 1999) had also the results of the increase of ratio of $1740/1510\text{ cm}^{-1}$ after fungal treatment with F1 on Wheat straw during 60 d solid-state fermentation, which pointed to oxidative alteration of aromatic lignin moieties. Pandey and Pitman (Pandey & Pitman, 2003) reported that the ratios of intensities of 898, 1158, 1375, 1738 against 1505 (Beech) or 1511 (Pine) cm^{-1} of *C.versicolor* treated Beech or Pine all increased after 28 d of incubation compared to the corresponding untreated sample, which showed *C. versicolor* with a slight preference for lignin degradation compared to carbohydrate. Hardwood (Chinese willow) and Softwood (China-fir) were treated by *E. taxodii* during 30 d, the ratios of intensities of 898, 1161, 1378 or 1373, 1737 or 1734 against 1506 or 1510 cm^{-1} of the two fungal treated wood samples increased, which indicated that *E. taxodii* could have great capacity of selective lignin degrading (Yu et al., 2009). The ratios of carbohydrate/lignin of bamboo clums treated by *T. versicolor* G20 decreased at advanced stages of pretreatment (after 60 d) although they increased at the early stage, which indicated that *T. Versicolor* G20 preferentially degrade lignin only at the early stage of pretreatment and the selectivity turned into a non-selective degradation with increasing pretreatment time (Zhang et al., 2007).

The TCI of five untreated biomasses varied from 0.93 for Acacia to 1.07 for Hazel, and the LOI ranging from 1.23 for Bagasse to 1.32 for Wheat straw. The TCI results in our study were less than those reported by Di Girolamo et al. (Di Girolamo et al., 2014), who evaluated the TCI of Barley straw, Giant reed and Fibre sorghum with 1.39, 1.45 and 1.55, respectively. According to Monlau et al. (Monlau et al., 2012), the LOI of 20 various lignocellulosic biomasses ranged from 0.85 to 1.22. The crystalline cellulose ranged from 16.39% for Bagasse to 19.91% for Wheat straw in our study, which were similar to those of Giant reed with 16.8% and Sunflower stalks for 17% (Monlau et al., 2012).

After fungal pretreatment, the TCI and LOI of the biomasses showed a substantial steadiness or a modest increase for Acacia. It is suggested that F1 and F2 should prefer to degrade amorphous cellulose to crystalline cellulose on Acacia. However, it seems likely that crystalline and amorphous cellulose of Barley and Wheat straw could be degraded simultaneously by the two fungi, because the proportion between crystalline and amorphous cellulose did not change significantly. Regarding Hazel and Bagasse, selective effect of degradation of lignin was significant, as the lignin content of the two biomasses reduced and cellulose content increased, thus, crystalline cellulose increased.

In general, small variations can be observed in the spectra of the autoclaved and CTL samples compared to those of the corresponding untreated samples. Moreover, it seems likely that the variations of spectra resulting from the autoclave or incubation without fungi process should depend on lignocellulose type, which is due to their different lignocellulosic composition and structure. It is suggested that to a certain extent autoclave and/or incubation without fungi process could influence the lignin and holocellulose functional groups, since the changes of certain bands related to lignin and polysaccharides were observed. In addition, the profile of the control sample of Hazel, Barley straw and Bagasse seem to be very close to that of corresponding autoclaved sample could suggest that the process of incubation without fungi should not have much impact on their structure. On the other hand, as for Acacia and Wheat straw, the contact between biomass and water for approximately a month probably hydrolyze cellulose and/or hemicellulose. Furthermore, fungal degradation of lignin could be confirmed by the reduction to different degrees of some of the bands assigned to lignin, which is consistent with the results of composition of components of the samples. The increase of the band at 1320 cm^{-1} in the spectra of fungal pretreated samples indicated that syringyl derivatives were produced during fungal pretreatment, which is probably due to the cleavage of β -O-4 aryl ether linkage. β -O-4 linkage is the most frequent bond inter-linking the phenylpropan units. *C. subvermispora* is effective to decompose the principal linkage even in early stage of wood decay when weight loss of the lignin is not prominent (Amirta et al., 2006). However, *C. subvermispora* seems to prefer to attack aromatic ring on Bagasse due to the reduction of the band at 1506 cm^{-1} . Therefore, it suggests that *C. subvermispora* could degrade lignin in different routes depending on lignocellulosic biomass type, since the reduction of different bands related to lignin were observed in the spectra of different biomasses. Moreover, despite the effects of fungal pretreatment by F1 and F2 on the structure of samples are often similar, it is suggested that sometimes even for the same biomass F1 and F2 should have different influences on functional groups. In addition, regarding the two straw samples, it seems likely that to some extent the two straw samples are similar to each other. For instance, the trend of changes of spectra of F1 or F2 pretreated Barley straw is similar to that of F1 or F2 pretreated Wheat straw. Similar conclusions could be obtained from the results of the activities of the ligninolytic enzymes Manganese Peroxidase and Laccase (data not shown).

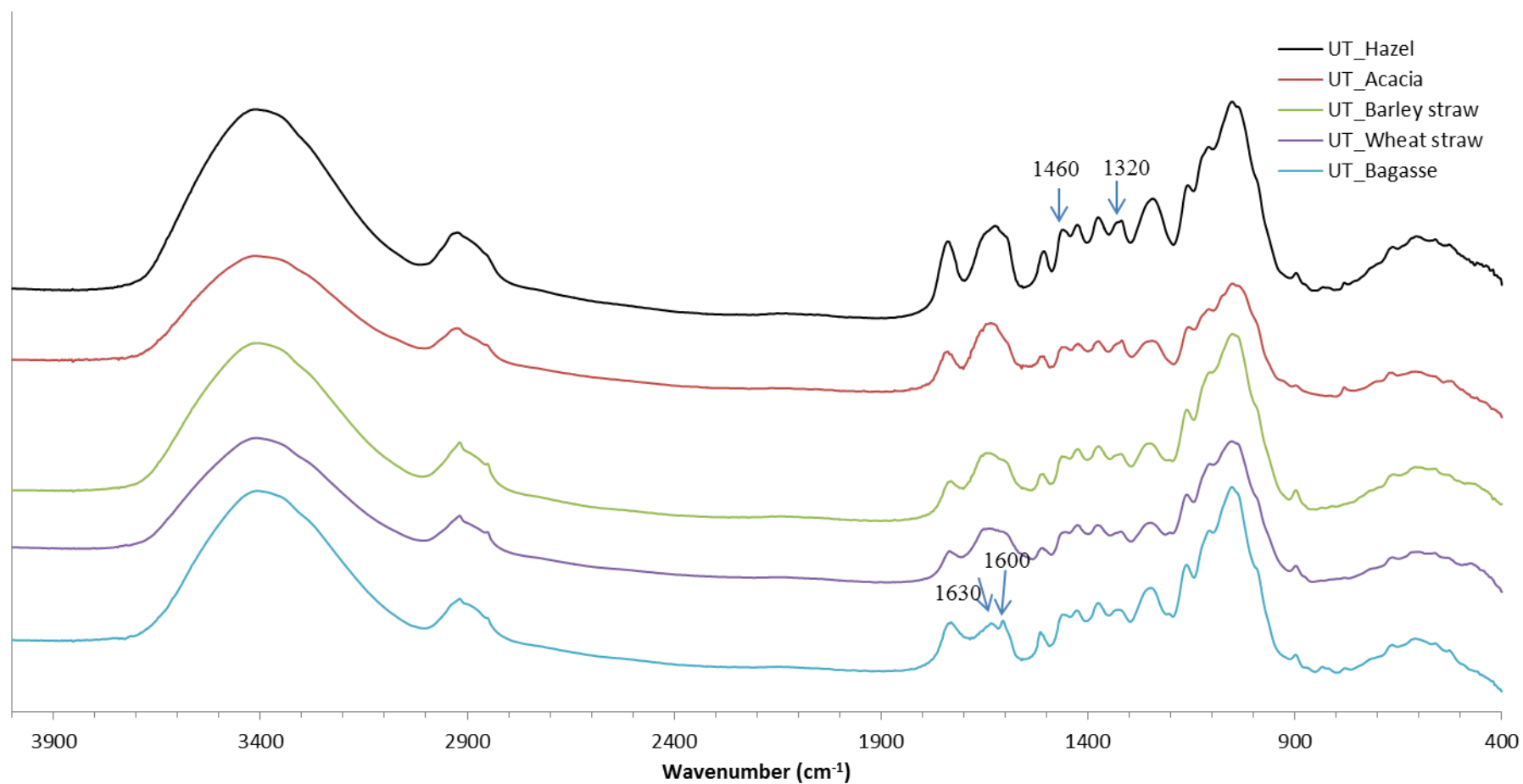
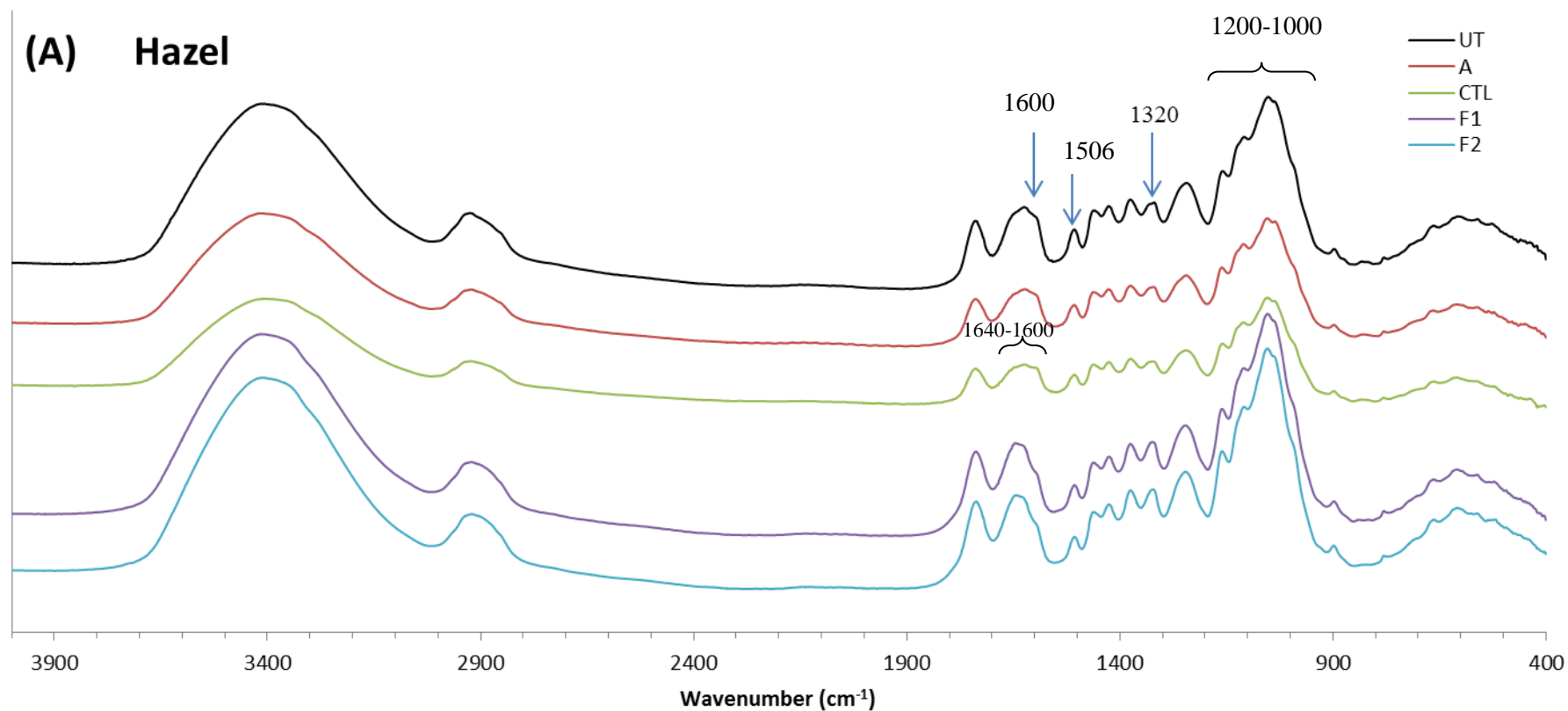
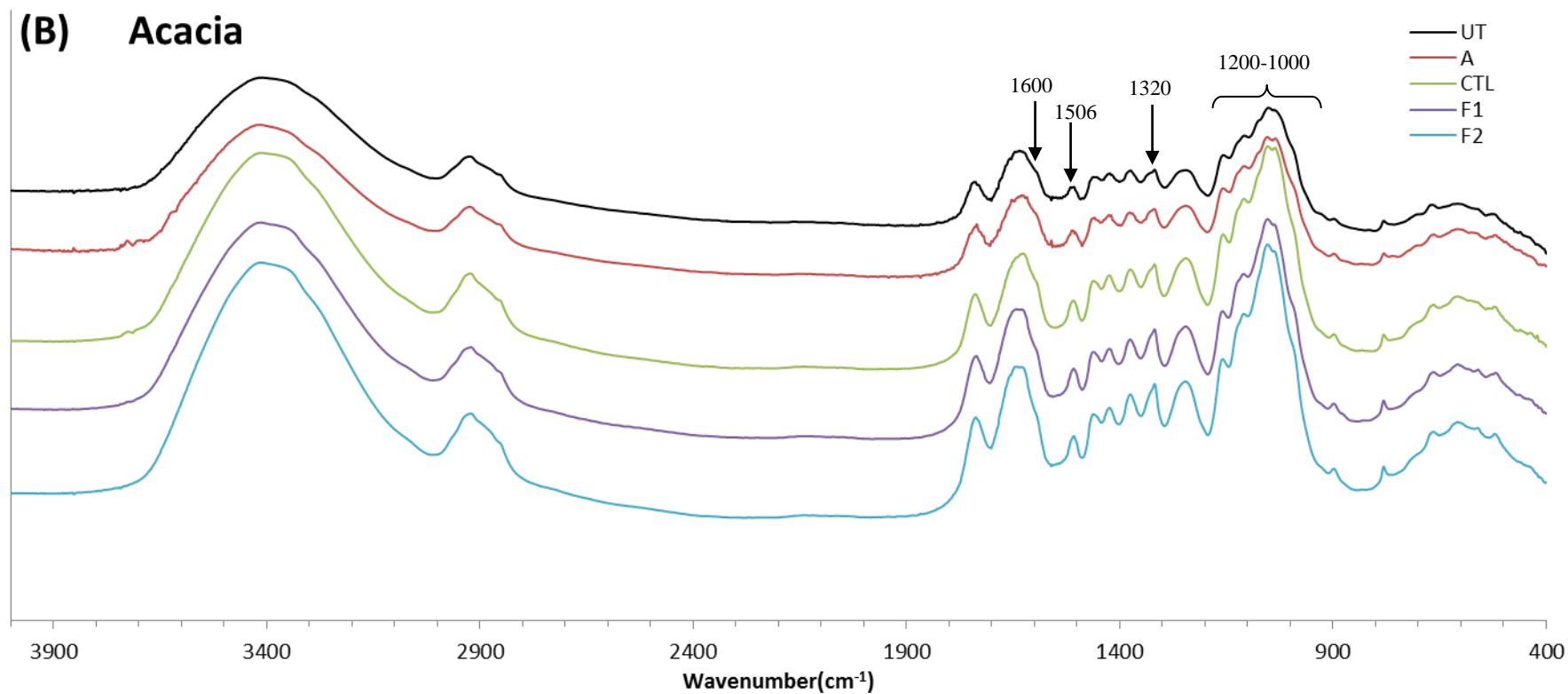
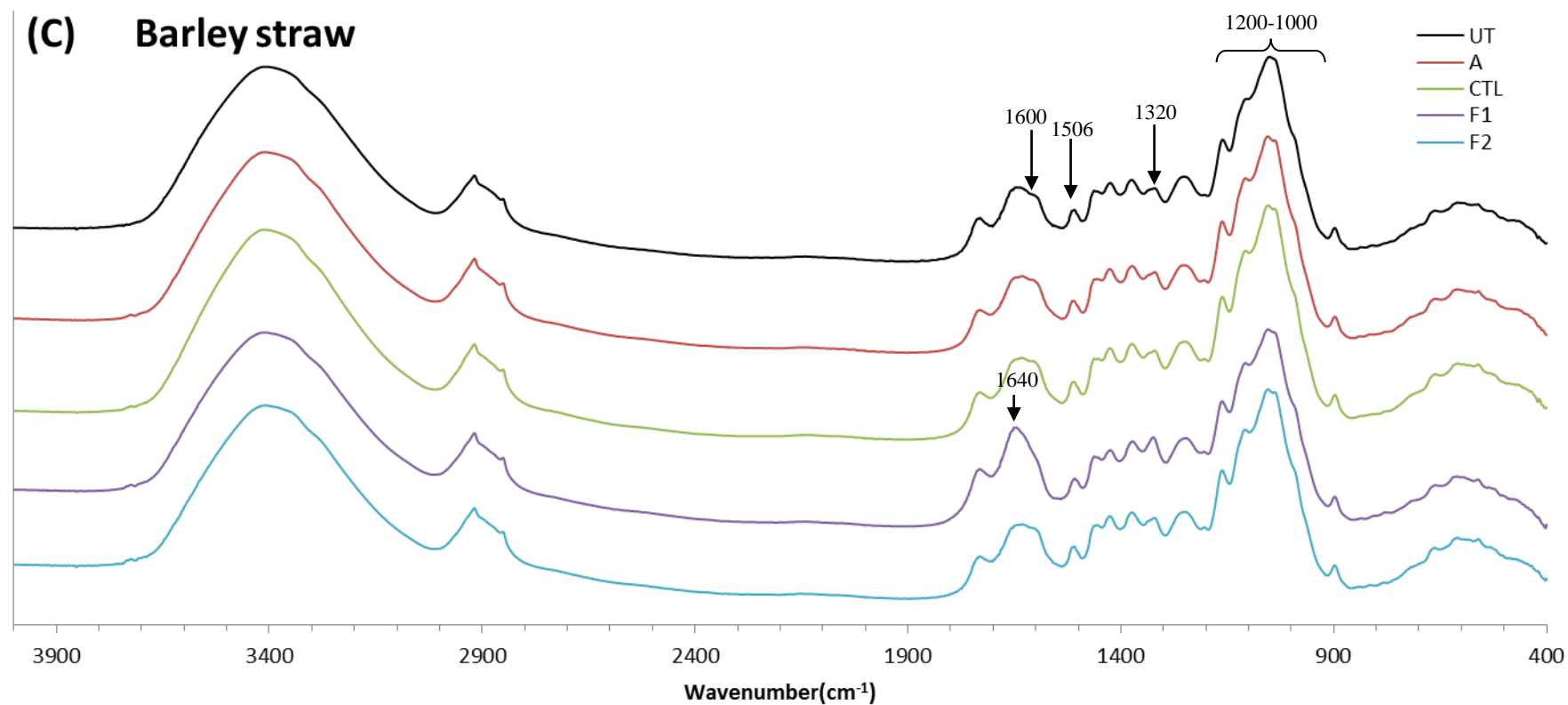
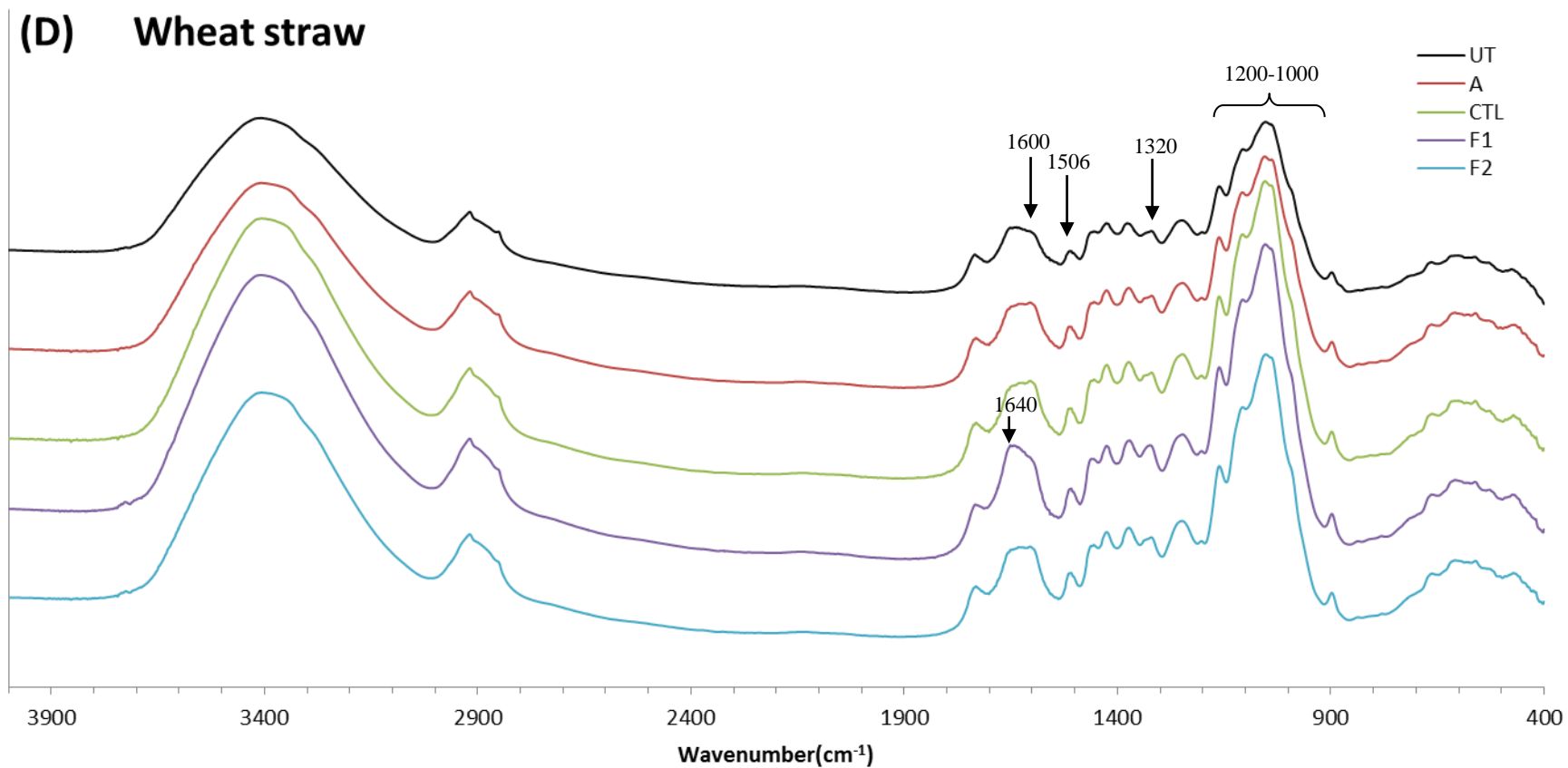


Figure.2 FTIR spectra of the five untreated biomasses: Hazel, Acacia, Barley straw, Wheat straw and Bagasse.









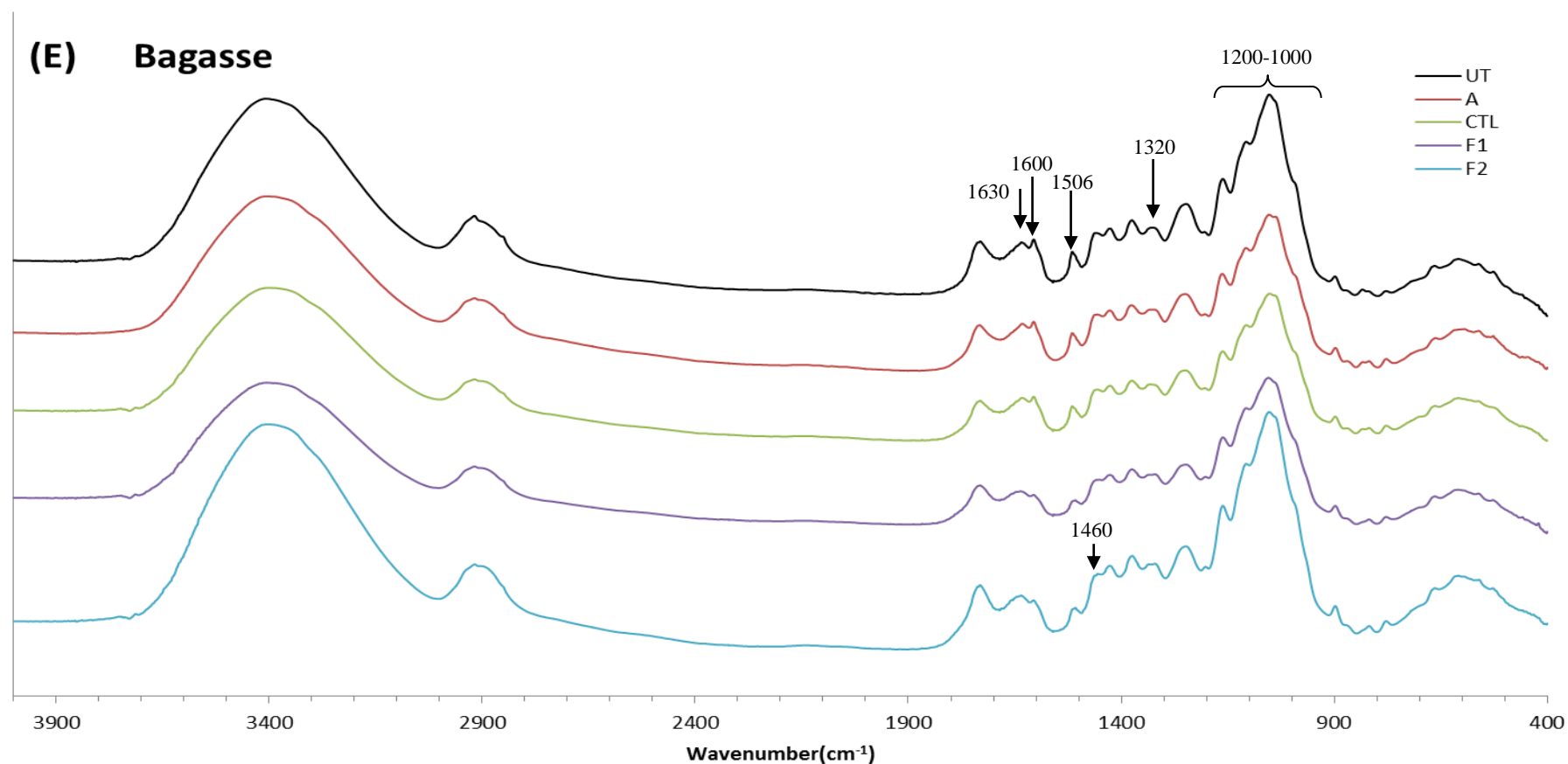


Figure 3 : FTIR spectra of the untreated, autoclaved, control, F1 and F2 samples: (A) Hazel, (B) Acacia, (C) Barley straw, (D) Wheat straw and (E) Bagasse.

Table 2. Ratios of the intensity of carbohydrate bands with lignin associated band Total Crystallinity Index (TCI), Lateral Order Index (LOI), crystalline cellulose (% of TS) for lignocellulosic biomass. Data reported in the parentheses correspond to standard deviation on triplicates.

Sample	I_{898}/I_{1506}	I_{1050}/I_{1506}	I_{1160}/I_{1506}	I_{1375}/I_{1506}	I_{1740}/I_{1506}	TCI	LOI	Crystalline cellulose (% of TS)
Hazel								
UT	0.88 (0.02)	1.84 (0.15)	1.37 (0.07)	1.19 (0.03)	1.06 (0.01)	1.07 (0.02)	1.30 (0.05)	17.39 (0.31)
A	0.83 (0.03)	1.68 (0.22)	1.29 (0.10)	1.15 (0.05)	1.04 (0.02)	1.04 (0.01)	1.35 (0.09)	16.57 (0.46)
CTL	0.87 (0.01)	1.60 (0.04)	1.24 (0.02)	1.12 (0.01)	1.04 (0.00)	1.02 (0.01)	1.25 (0.02)	16.78 (0.10)
F1	0.90 (0.02)	2.23 (0.02)	1.55 (0.01)	1.30 (0.01)	1.24 (0.00)	1.12 (0.02)	1.32 (0.03)	18.75 (0.19)
F2	1.02 (0.12)	2.28 (0.10)	1.58 (0.05)	1.31 (0.03)	1.25 (0.01)	1.04 (0.16)	1.28 (0.03)	18.51 (0.21)
Acacia								
UT	0.84 (0.01)	1.41 (0.03)	1.16 (0.01)	1.09 (0.01)	1.03 (0.00)	0.93 (0.01)	1.27 (0.03)	18.41 (0.18)
A	0.87 (0.01)	1.43 (0.08)	1.18 (0.04)	1.08 (0.01)	1.03 (0.01)	0.96 (0.02)	1.22 (0.01)	17.77 (0.06)
CTL	0.80 (0.00)	1.85 (0.09)	1.35 (0.05)	1.17 (0.02)	1.04 (0.00)	1.01 (0.02)	1.40 (0.02)	19.84 (0.11)
F1	0.79 (0.01)	1.82 (0.03)	1.32 (0.01)	1.16 (0.00)	1.08 (0.01)	1.03 (0.02)	1.38 (0.02)	18.51 (0.11)
F2	0.84 (0.01)	2.01 (0.13)	1.42 (0.07)	1.22 (0.03)	1.10 (0.01)	1.09 (0.00)	1.35 (0.03)	19.30 (0.20)
Barley straw								
UT	0.90 (0.00)	1.83 (0.00)	1.38 (0.00)	1.16 (0.00)	0.96 (0.00)	0.98 (0.00)	1.26 (0.01)	19.76 (0.05)
A	0.92 (0.01)	1.93 (0.01)	1.45 (0.00)	1.20 (0.00)	0.95 (0.00)	0.97 (0.00)	1.27 (0.02)	18.30 (0.11)
CTL	0.92 (0.01)	1.95 (0.16)	1.46 (0.07)	1.20 (0.03)	0.94 (0.01)	0.99 (0.01)	1.28 (0.02)	18.18 (0.11)
F1	0.91 (0.00)	1.74 (0.00)	1.39 (0.00)	1.18 (0.00)	1.05 (0.00)	0.97 (0.00)	1.25 (0.00)	16.94 (0.00)
F2	0.90 (0.02)	1.89 (0.17)	1.44 (0.07)	1.20 (0.04)	0.95 (0.01)	0.98 (0.00)	1.30 (0.06)	18.05 (0.38)
Wheat straw								
UT	0.86 (0.06)	1.63 (0.03)	1.32 (0.01)	1.13 (0.01)	0.99 (0.01)	0.95 (0.01)	1.32 (0.10)	19.91 (0.68)
A	0.93 (0.00)	1.79 (0.00)	1.42 (0.00)	1.18 (0.00)	0.94 (0.00)	1.01 (0.00)	1.25 (0.00)	18.38 (0.00)
CTL	0.89 (0.00)	2.13 (0.14)	1.56 (0.06)	1.23 (0.03)	0.92 (0.01)	1.03 (0.01)	1.34 (0.02)	15.54 (0.10)

F1	0.88 (0.00)	2.14 (0.00)	1.56 (0.00)	1.22 (0.00)	0.93 (0.00)	0.99 (0.00)	1.34 (0.00)	18.52 (0.00)
F2	0.90 (0.00)	2.10 (0.00)	1.54 (0.00)	1.23 (0.00)	0.92 (0.00)	1.03 (0.00)	1.32 (0.00)	18.80 (0.02)
Bagasse								
UT	0.90 (0.02)	1.70 (0.03)	1.33 (0.01)	1.15 (0.00)	1.05 (0.01)	0.99 (0.01)	1.23 (0.02)	16.39 (0.12)
A	0.91 (0.00)	1.70 (0.02)	1.35 (0.02)	1.17 (0.01)	1.04 (0.01)	0.98 (0.02)	1.24 (0.01)	15.39 (0.06)
CTL	0.94 (0.02)	1.73 (0.24)	1.35 (0.11)	1.16 (0.05)	1.04 (0.02)	0.97 (0.03)	1.21 (0.06)	16.62 (0.40)
F1	0.98 (0.00)	1.61 (0.00)	1.31 (0.00)	1.16 (0.00)	1.08 (0.00)	0.99 (0.00)	1.15 (0.00)	20.46 (0.00)
F2	1.01 (0.01)	1.94 (0.06)	1.50 (0.03)	1.26 (0.02)	1.12 (0.01)	1.03 (0.00)	1.19 (0.00)	20.76 (0.03)

IX.4.3. TG-DSC measurements

The TG, DTG and DSC curves of all the samples of the five biomasses (UT, A, CTL, F1 and F2) are presented in Fig.4, 5 and 6. As can be seen, all the samples have three distinct stages of mass loss: dehydration (25°C - $160 \pm 10^{\circ}\text{C}$, except 120°C for Bagasse), active pyrolysis ($160 \pm 10^{\circ}\text{C}$ - 510°C), passive pyrolysis (510°C - 800°C). Similar results were reported by Yang et al. (Yang et al., 2010), however, in which the range of the stage of active pyrolysis of corn stover was a little narrower (140°C - 360°C). In general, the mass loss in temperature range of 220 - 315°C (Yang et al., 2007), 250°C - 330°C and 330°C - 400°C is considered to be associated with hemicellulose, cellulose and lignin, respectively (combustion process continues beyond 400°C) (Franceschi et al., 2008). However, other temperature ranges with some modest differences have been also reported. 200 - 350°C is progressive degradation of the carbohydrates and aliphatic compounds and some easily biodegradable aromatic structure, while 400 - 500°C is related to more complex aromatic structures with high molecular weights, such as lignin (El Ouaquoudi et al., 2015).

The mass loss due to humidity of all the samples (UT, A, CTL, F1 and F2) of the five biomasses were between 4.3% for Acacia control samples and 7.0% for F2 pretreated Barley straw. As for active pyrolysis stage, except for Bagasse, above about 200°C the decreases of mass loss of the four other biomasses were significant, whereas after dehydration until 200°C their TG curves exhibited a plateau of mass loss. On the contrary, Bagasse showed less thermostability in this temperature range, which may be due to that it contains more water extractives, part of which could be easily combusted.

In our case, the mass loss (of organic matter weight) associated with the peak Exo 1 ($160 \pm 10^{\circ}\text{C}$ - $365 \pm 15^{\circ}\text{C}$) of the five untreated biomasses were similar, between 68.7% for Barley straw and 71.0% for Bagasse. Likewise, the mass loss associated with the peak Exo 2 ($365 \pm 15^{\circ}\text{C}$ - 510°C) were between

29.0% for Bagasse and 31.3% for Barley straw, since the sum of mass losses of the two Exo peak is considered as the weight of total organic matter.

In this study, two indices R_1 and R_2 are used for evaluating the stability of all the samples (UT, A, CTL, F1 and F2) of the five biomasses. R_1 refers to the mass loss of Exo 2 against that of Exo 1, which is considered as a reliable parameter for evaluating the level of maturation of organic matter in composts (Dell'Abate et al., 2000; Dell'Abate et al., 1998; El Ouaquoudi et al., 2015; Fernández et al., 2012; Plante et al., 2009). On the other hand, R_2 is defined as the ratio between ΔH_2 the enthalpies of combustion per milligram organic matter associated with the peak Exo 2 (J mg^{-1}) and ΔH_1 the enthalpies of combustion per milligram organic matter associated with the peak Exo 1 (J mg^{-1}) (Achour, 2008).

The ratios (R_1) of all the samples (UT, A, CTL, F1 and F2) of the five biomasses were between 0.39 for Bagasse CTL and 0.59 for F1 or F2 pretreated Acacia. The R_1 values in this study are lower than those of the composts at different stages of stabilization originated from lignocellulosic residues and recycled compost in different ratio (Dell'Abate et al., 1998) and those of different organic municipal waste compost (Fernández et al., 2012), but slightly higher than those of two types of lignocellulose compost (El Ouaquoudi et al., 2015).

In general, in this study the R_1 values of all the samples except the untreated, autoclaved and control samples of Hazel were higher than the ratio between lignin content and the sum of content of the cellulose and hemicellulose of the corresponding sample, which suggests that part of water and/or ethanol extractives should contribute to the peak Exo 2. The R_1 of Acacia samples after some treatment (A, CTL, F1 and F2) increased significantly compared to that of untreated Acacia, while the increase of those of Hazel samples is modest. However, the R_1 of F1 or F2 pretreated Bagasse were slightly lower than that of untreated sample, which could be due to the relatively lower lignin content of F1 or F2 pretreated Bagasse. Regarding fungal pretreated Barley and Wheat straw, it seems likely that F1 could increase significantly the R_1 value, which indicated that F1 metabolism could product higher thermostability metabolite than F2, which may be the cause of the increase of intensity of the band at 1640 cm^{-1} .

Regarding each biomass, although the TG curves did not change significantly, the DTG curves more clearly showed the differences among the untreated, autoclaved, control, F1 and F2 samples. From the DTG curves of the samples (UT, A, CTL, F1 and F2) of Hazel, Acacia and Bagasse, it is suggested that autoclave, incubation without fungi and fungal pretreatment could shift to different degrees the peak of combustion of organic matter towards lower temperatures, increase the thermal decomposition rate and further shorten the temperature range of decomposition slightly, which is similar to the results reported earlier (Yang et al., 2010; Yu et al., 2015; Zeng et al., 2011). On the other hand, it should be

noted that the small peak of decomposition rate appeared around 440°C for Barley straw and around 420°C for Wheat straw in the DTG curves of the two straw treated samples (A, CTL, F1 and F2). It is suggested that a single and quick reaction may take place around 440°C for Barley straw and around 420°C for Wheat straw and the reactant(s) involved could be yield during autoclave. Moreover, incubation or fungal pretreatment process probably could not remove the impact, since the small peak was also observed in the DTG curves of the other samples (CTL, F1 and F2) of the two straw biomasses. Further, it seems likely that in this study Barley straw is similar to Wheat straw, since the two straw biomasses exhibited similar thermal behavior. Regarding Bagasse, a similar but less significant peak than those of the two straw samples were also observed in the DTG curves of the treated samples (A, CTL, F1 and F2). Regarding Acacia, the DTG curves of the autoclaved and control Acacia are nearly same, and the same cases are also observed for those of F1 and F2 pretreated Acacia. Furthermore, the maximum temperature of the peak corresponding peak Exo 2 ranging from around 350°C to around 500°C of the curves of autoclaved and CTL Acacia are lower compared with that of untreated Acacia. Likewise, the shift toward lower temperature of the same peak of DTG curves of F1 and F2 pretreated Acacia were observed as well compared with those of autoclaved and CTL Acacia. Regarding the cases of Hazel and Bagasse, their extent of shift of temperature of the peak Exo 2 are less significant than that of Acacia.

Regarding the DSC profiles of the five biomasses, it can be seen that the treated samples (A, CTL, F1 and F2) of Hazel and Bagasse showed an increase of the intensity in the range of peak Exo 2 to different degrees. Moreover, a slight shift to lower temperature of the treated samples of Hazel and Bagasse could be observed. However, the treated samples (A, CTL, F1 and F2) of Acacia exhibited a more significant increase of intensity than those of Hazel and Bagasse, meanwhile with a more significant shift toward lower temperature. As for the two straw biomasses, a new peak appeared around 440°C for Barley straw and around 420°C for Wheat straw, which may be due to autoclave process. However, different result was reported before. DSC analysis of woody samples decayed by white-rot fungus *Fomes fomentarius* showed that the maximum temperature of the peak associated with lignin was shifted about 35°C upwards (Reh et al., 1986), which may be due to the different types of biomass and species of fungi.

The significant increase of R_2 of the treated samples (A, CTL, F1 and F2) of all the five biomasses were observed, whatever the extent of selective degradation of lignin, which may indicate that different treatment process make the samples of the five biomasses more stable than corresponding untreated sample. The increase of R_2 is probably due to that autoclave, incubation without fungi or fungal pretreatment could to a certain extent break down some bonds of the relative easily-degradable compositions, such as part of water or ethanol extractives, including non-structural sugars, some nitrogenous materials, hemicellulose and/or cellulose, and meanwhile these different treatment process (autoclave, incubation without fungi or fungal pretreatment) could product some more higher

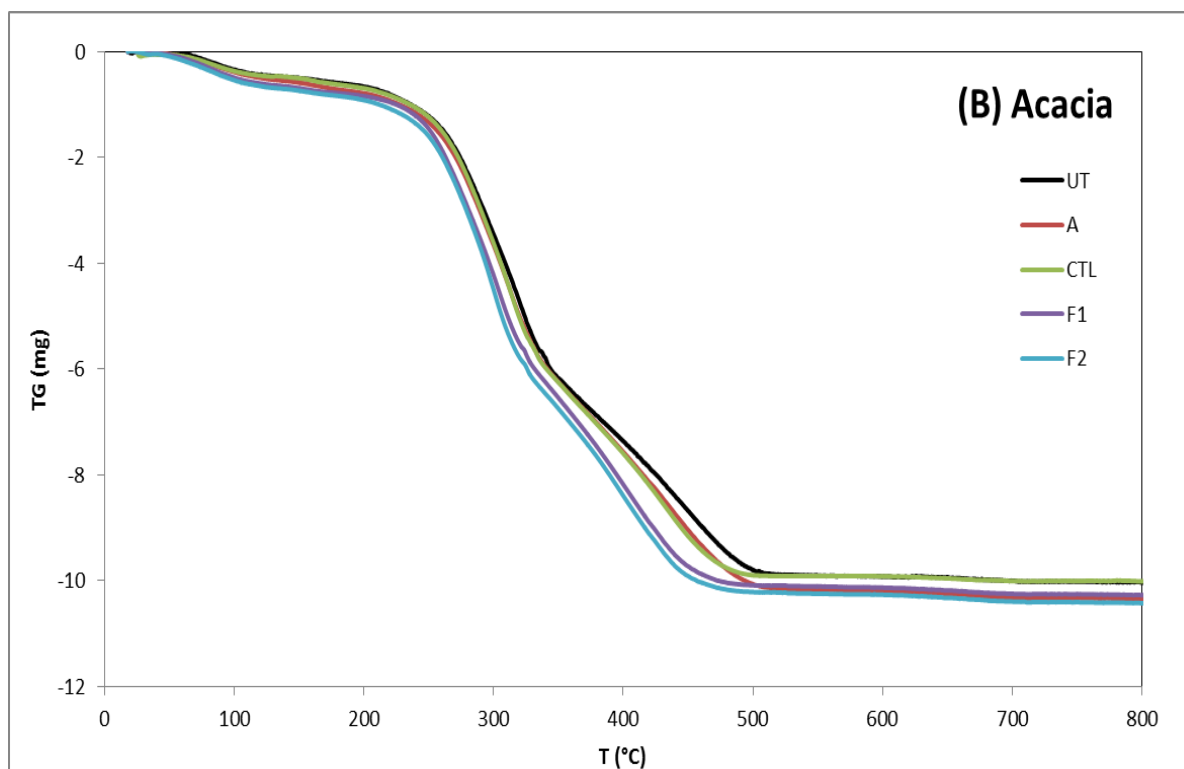
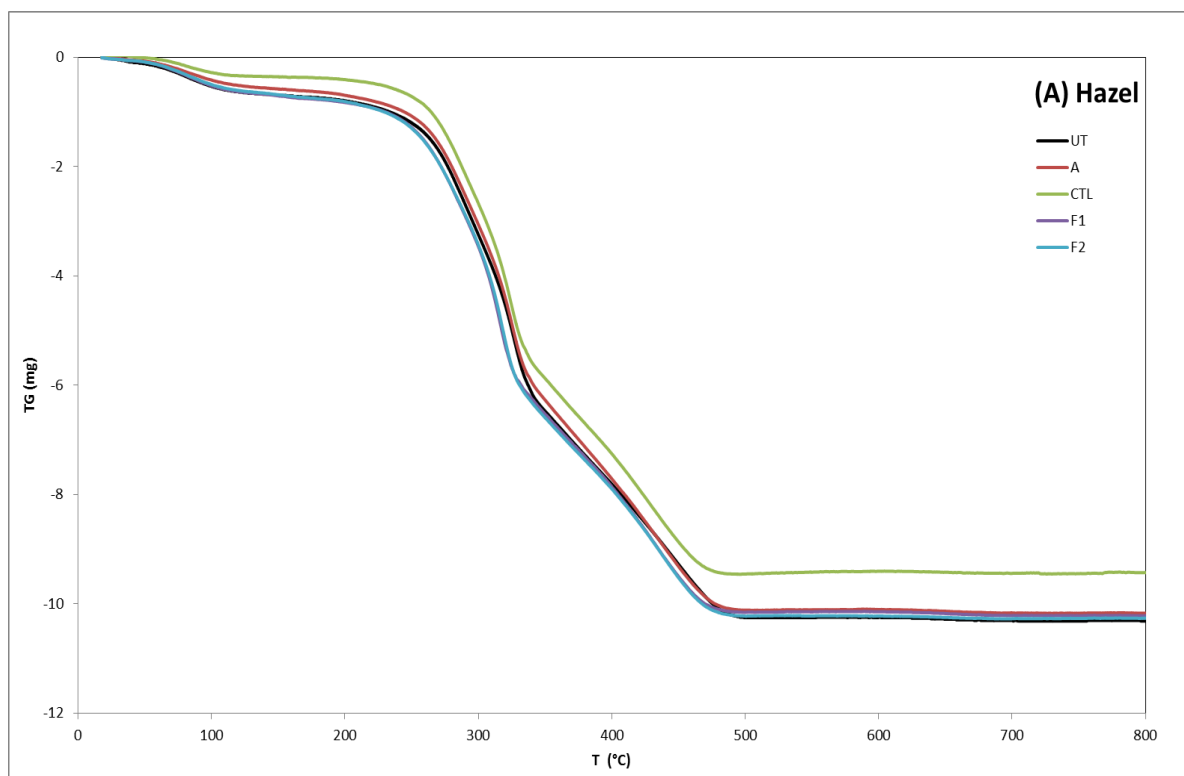
thermostability products. The shift toward lower temperature may be explained by that different treatment process (autoclave, incubation without fungi or fungal pretreatment) could loosen the structure of the samples (A, CTL, F1 and F2) of the five biomasses, which was consistent with the results of ECD (except for the control of Acacia), and further increase the thermal decomposition rate.

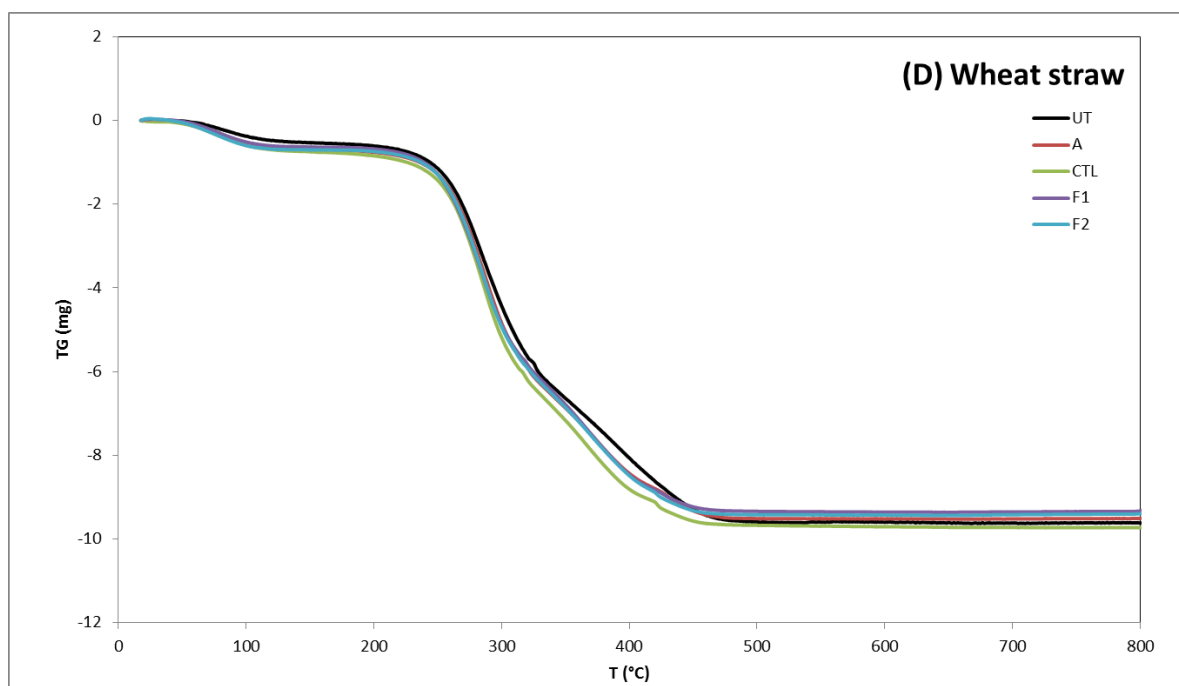
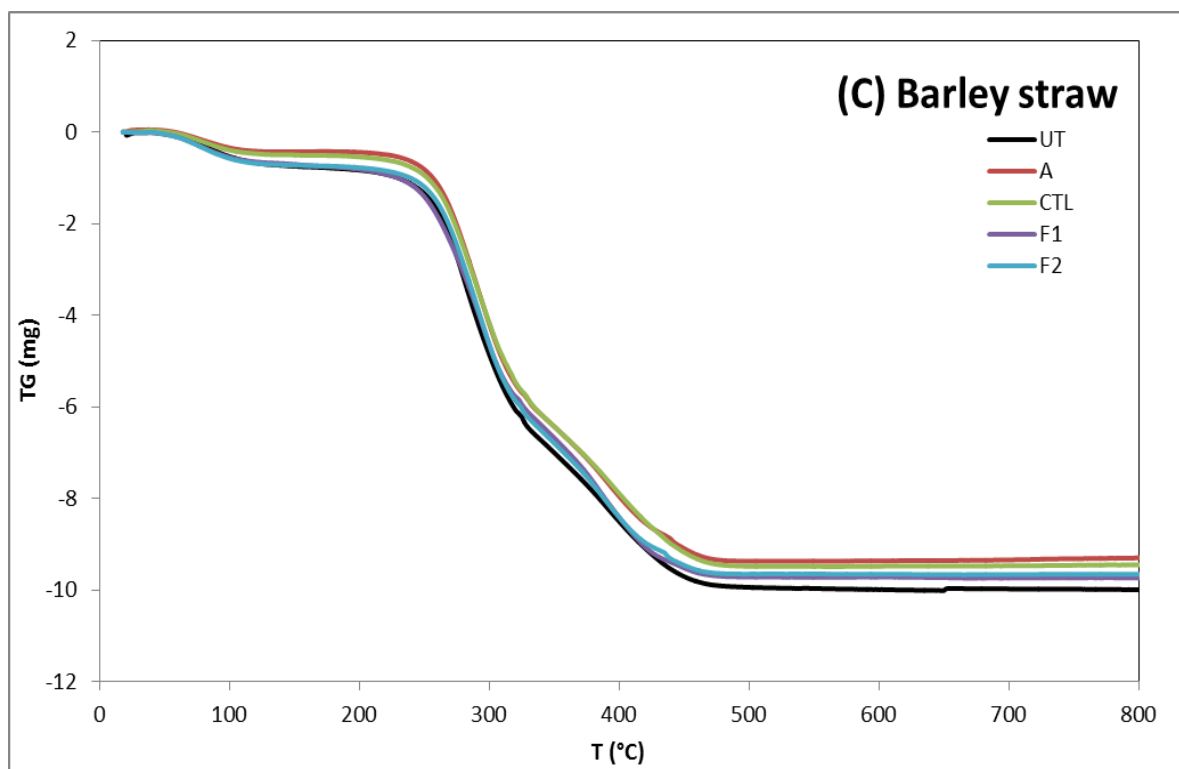
Table 4. R_1 and R_2 of all the samples. Data reported as mean \pm standard deviation on triplicates.

Sample	R_1	R_2
Hazel		
UT	0.42 ± 0.00	2.36 ± 0.04
A	0.43 ± 0.08	3.77 ± 0.52
CTL	0.46 ± 0.02	4.14 ± 0.41
F1	0.48 ± 0.01	4.51 ± 0.21
F2	0.47 ± 0.02	4.67 ± 0.37
Acacia		
UT	0.45 ± 0.01	1.83 ± 0.19
A	0.53 ± 0.04	2.88 ± 0.13
CTL	0.48 ± 0.01	2.73 ± 0.03
F1	0.59 ± 0.02	2.89 ± 0.06
F2	0.59 ± 0.03	3.07 ± 0.21
Barley straw		
UT	0.46 ± 0.01	2.12 ± 0.05
A	0.48 ± 0.01	2.96 ± 0.06
CTL	0.53 ± 0.10	2.73 ± 0.46
F1	0.58 ± 0.00	2.95 ± 0.10
F2	0.48 ± 0.00	2.92 ± 0.07
Wheat straw		
UT	0.43 ± 0.00	2.26 ± 0.15
A	0.44 ± 0.00	2.53 ± 0.04
CTL	0.47 ± 0.00	2.12 ± 0.00
F1	0.52 ± 0.00	2.91 ± 0.00
F2	0.48 ± 0.02	2.91 ± 0.10

Bagasse

UT	0.41 ± 0.00	2.29 ± 0.07
A	0.42 ± 0.04	3.59 ± 0.34
CTL	0.39 ± 0.01	3.42 ± 0.35
F1	0.40 ± 0.01	3.61 ± 0.17
F2	0.40 ± 0.02	3.47 ± 0.35





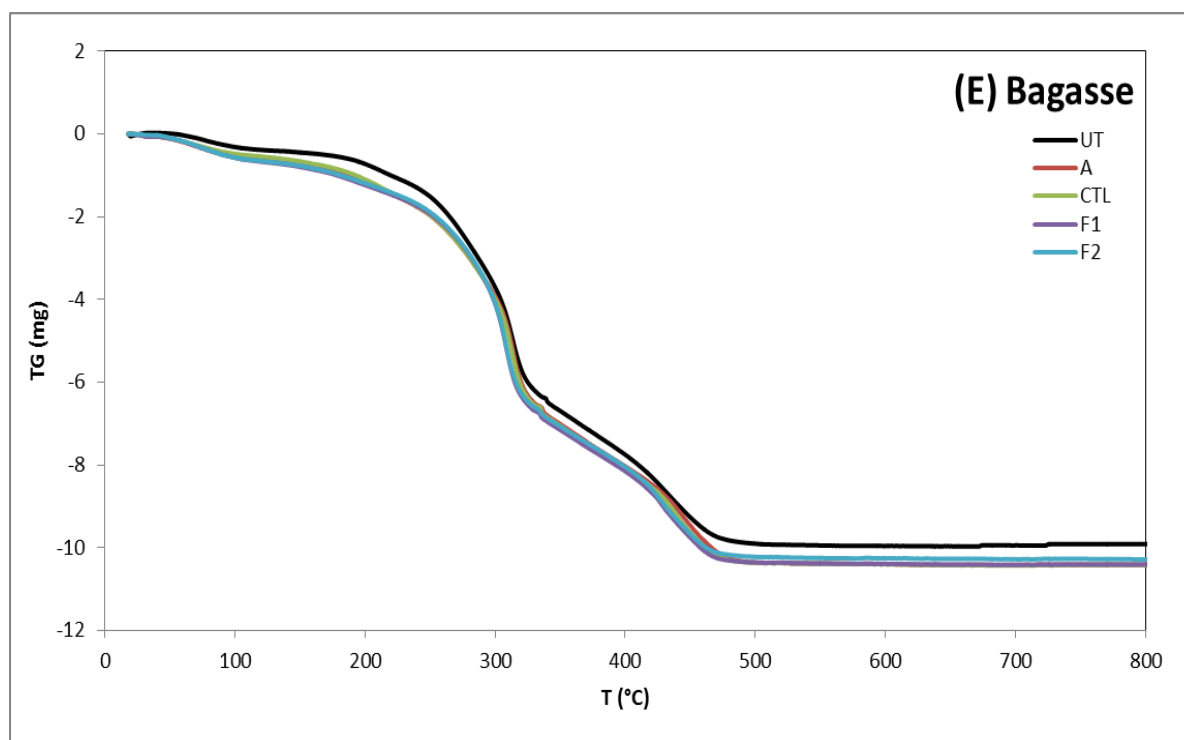
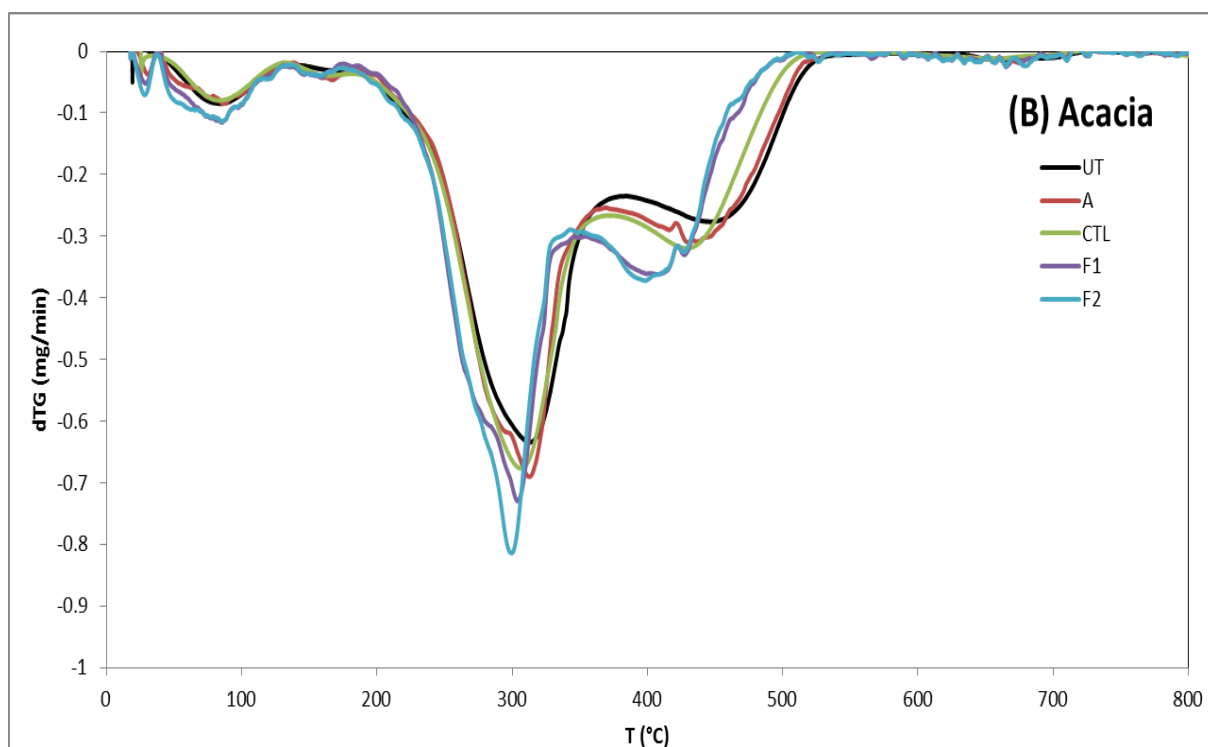
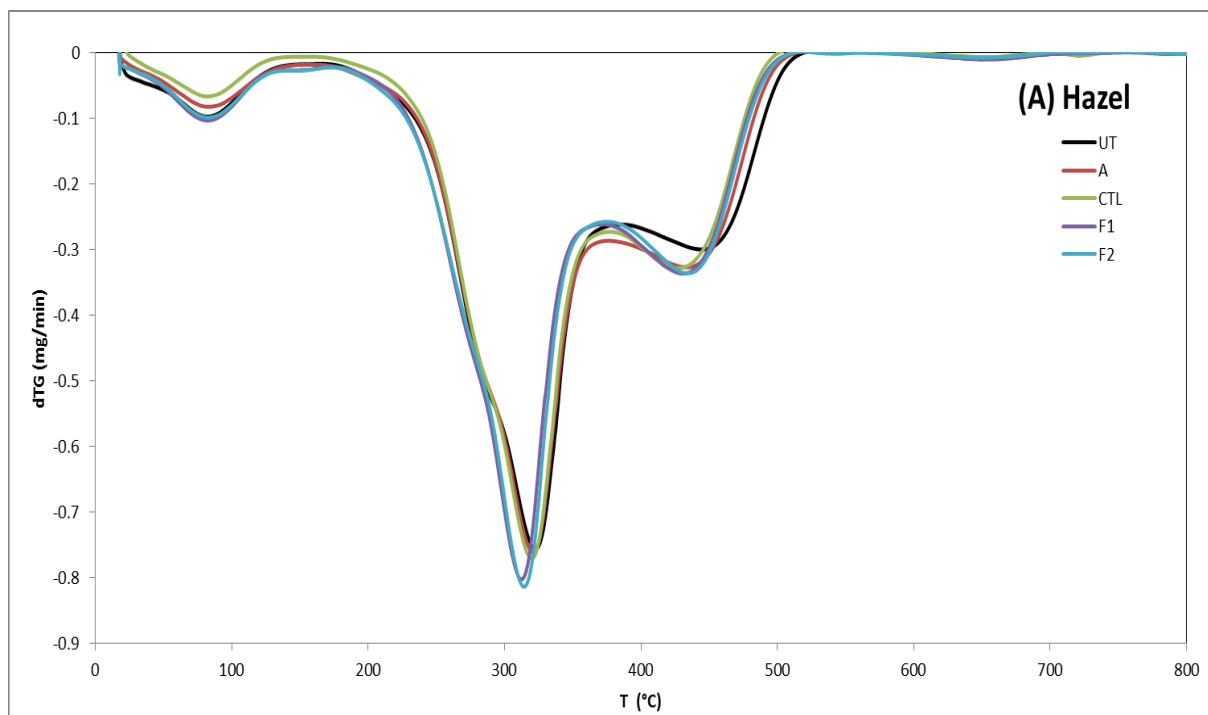
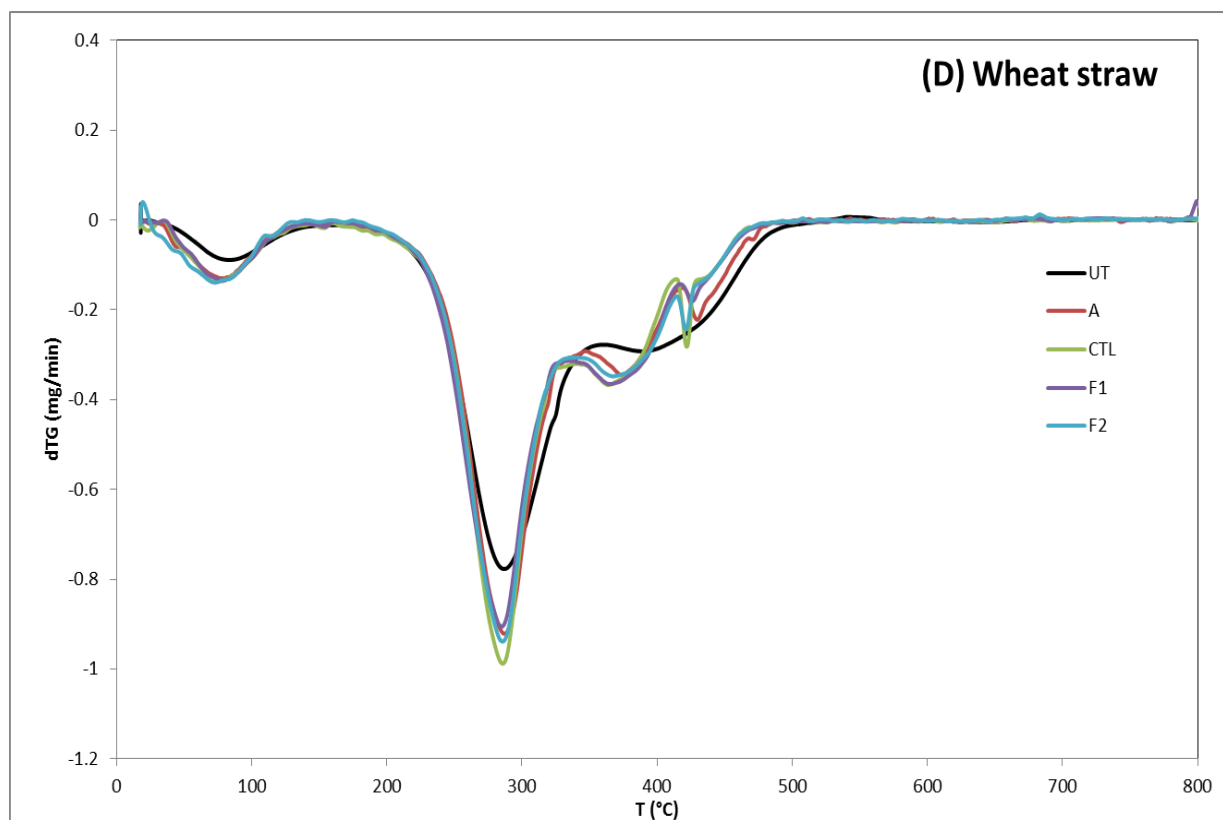
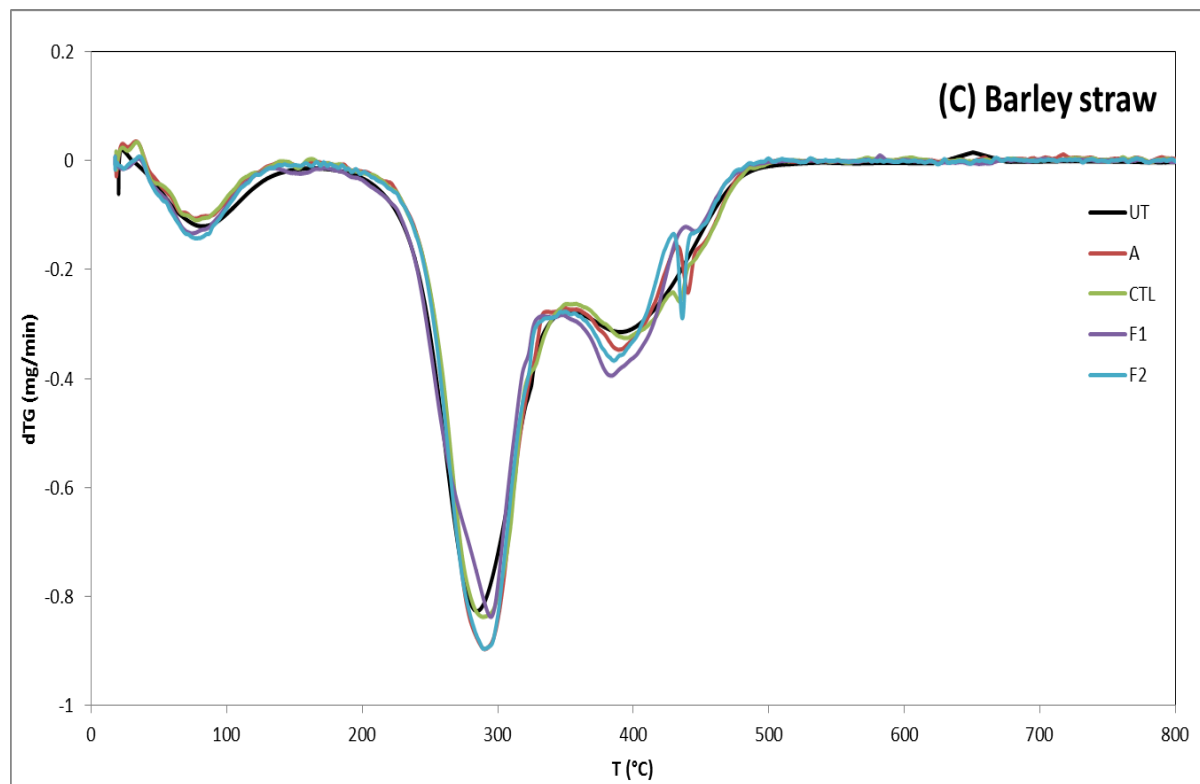


Figure 4 : TG curves of the untreated, autoclaved, control, F1 and F2 samples: (A) Hazel, (B) Acacia, (C) Barley straw, (D) Wheat straw and (E) Bagasse.





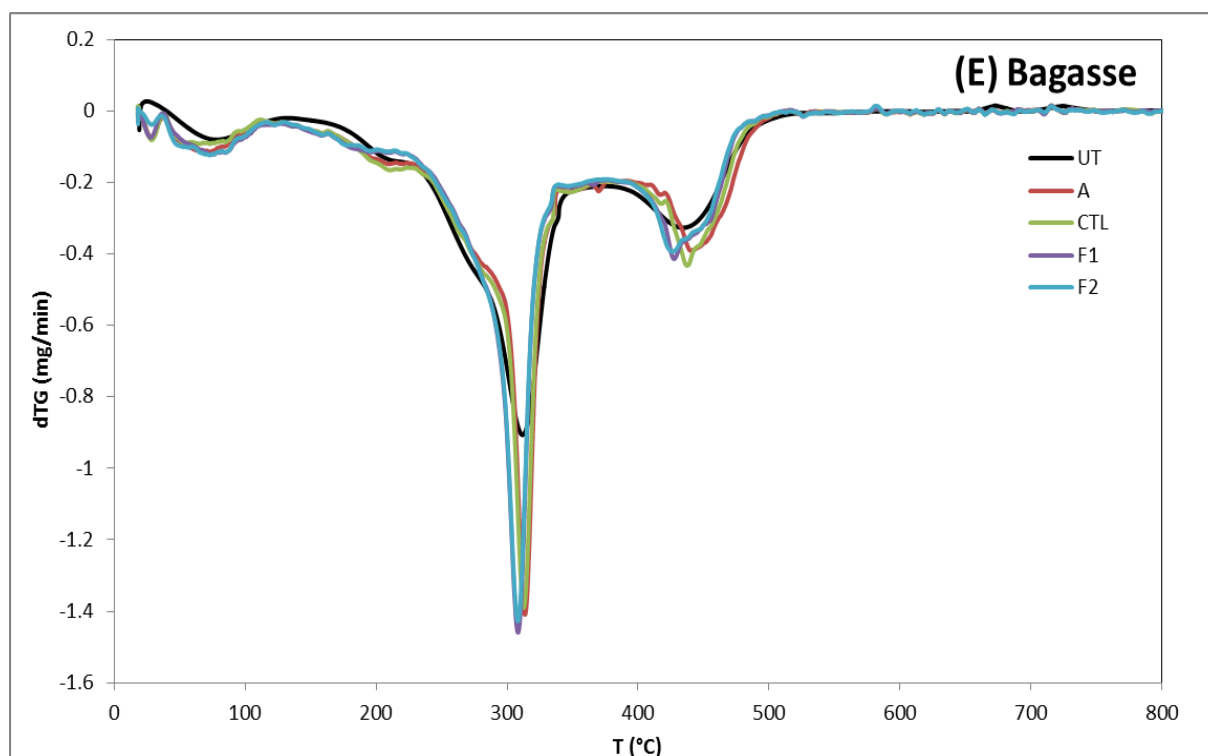
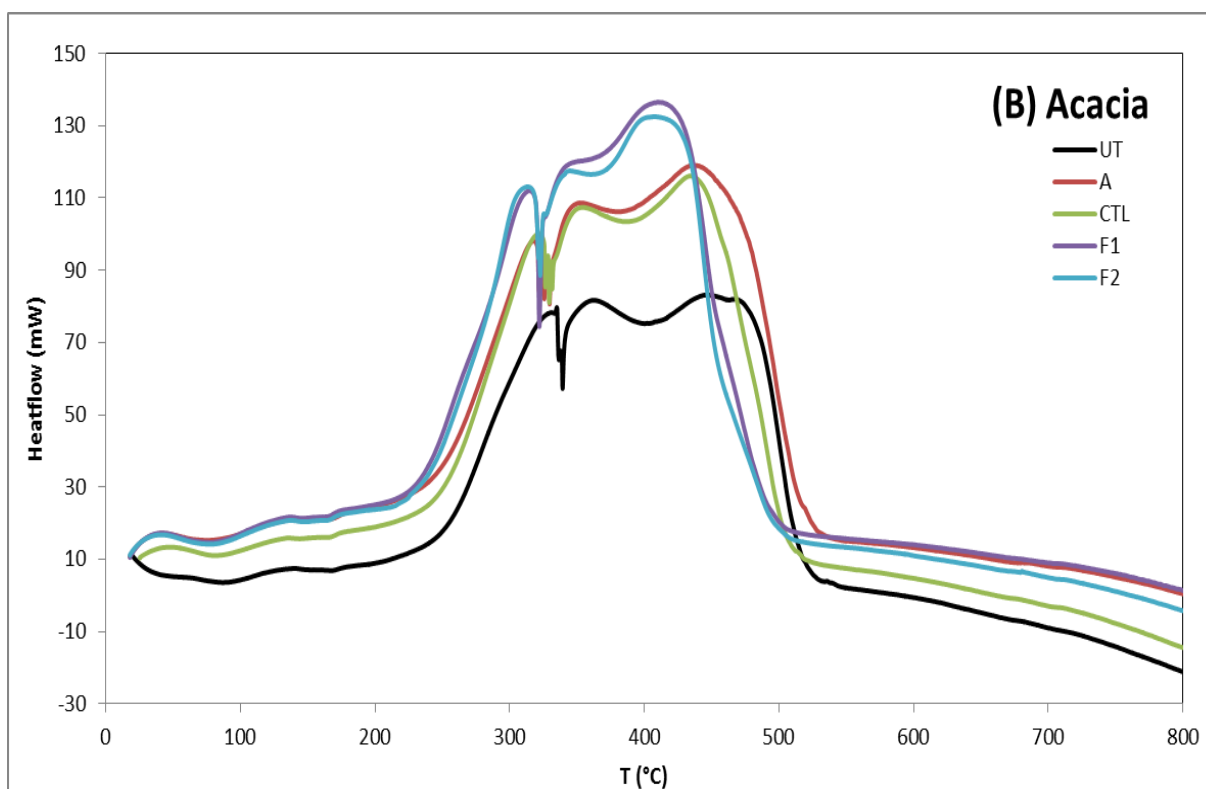
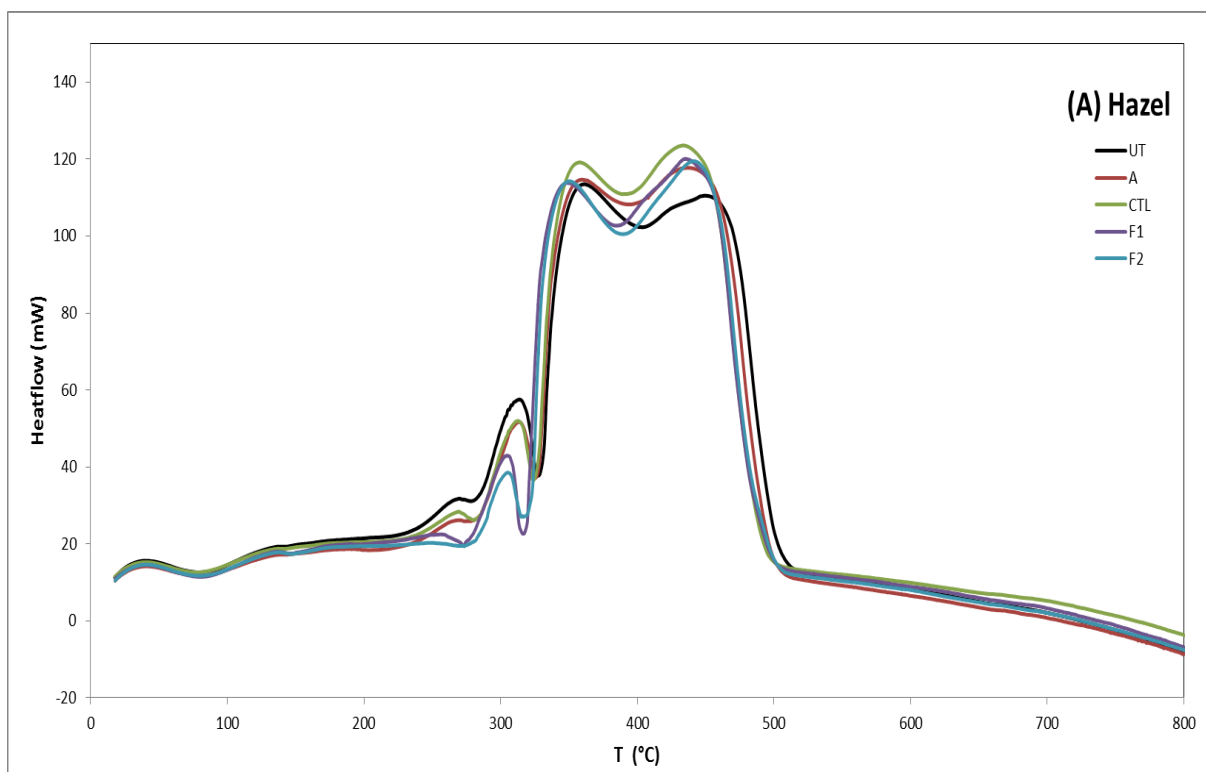
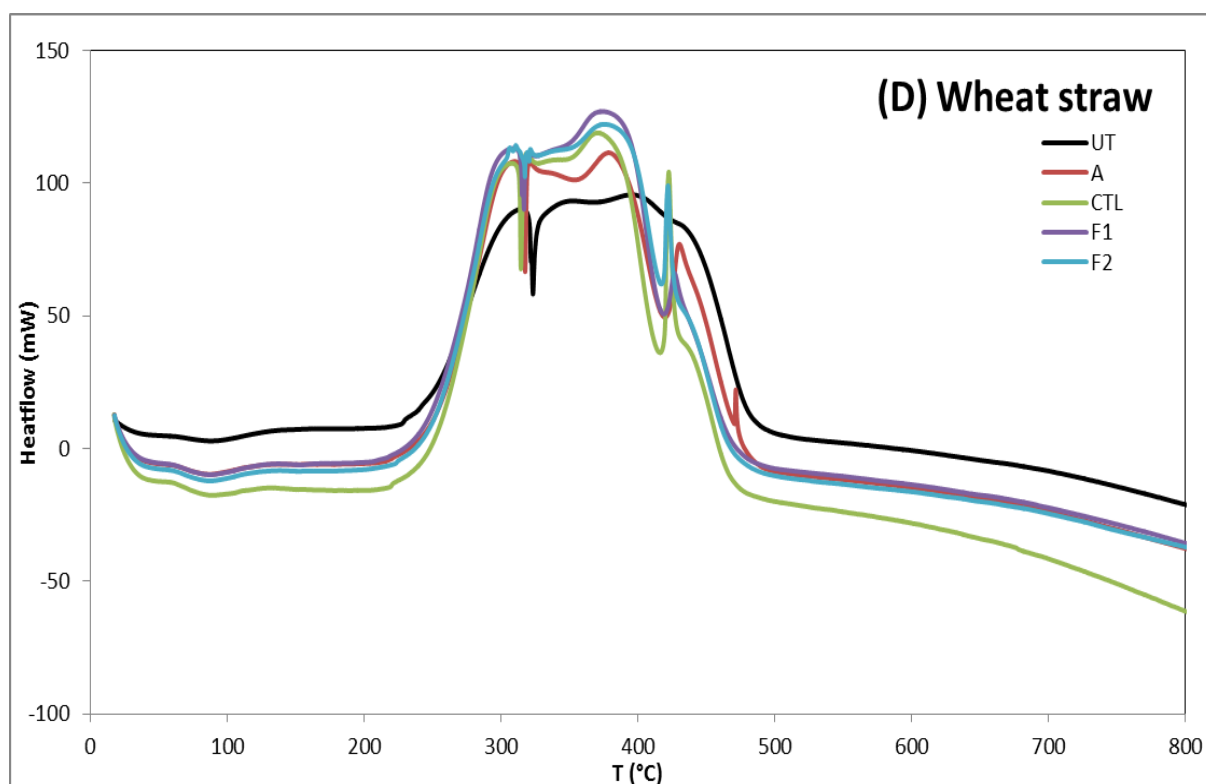
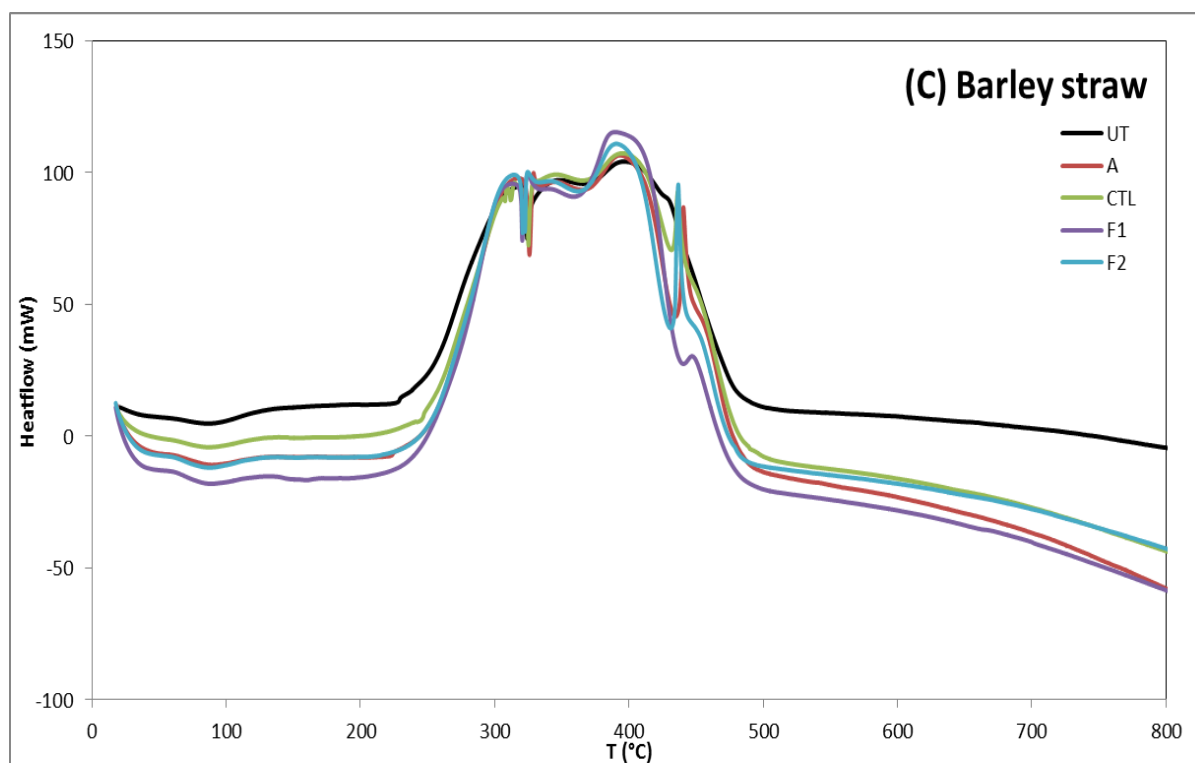


Figure 5 : DTG curves of the untreated, autoclaved, control, F1 and F2 samples: (A) Hazel, (B) Acacia, (C) Barley straw, (D) Wheat straw and (E) Bagasse.





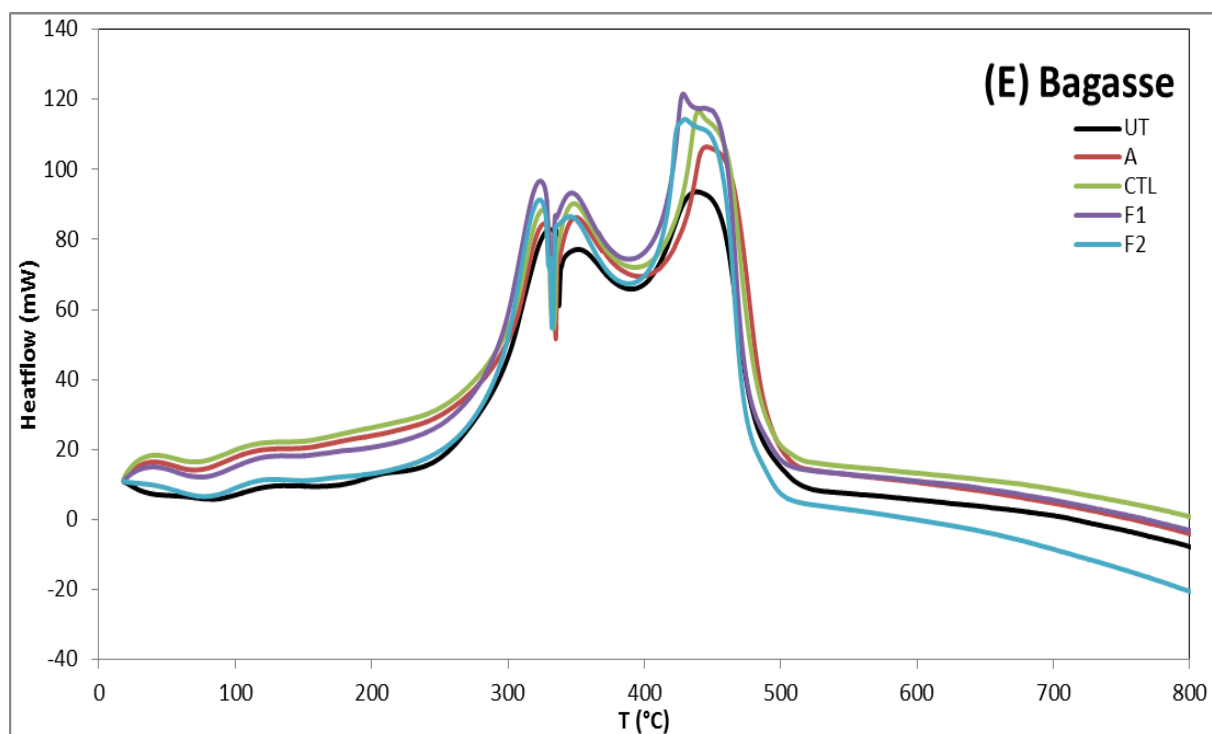


Figure 6 : DSC curves of the untreated, autoclaved, control, F1 and F2 samples: (A) Hazel, (B) Acacia, (C) Barley straw, (D) Wheat straw and (E) Bagasse.

IX.4.4. Analytical results and general correlation using PCA

PCA analysis enables the evaluation of the inter-relationships between the samples and the variables (Fang et al., 2012; Li et al., 2014; Ni et al., 2015). As can be seen from Fig. 7, the first three components explain 75.34% of the total variance (33.17%, 22.32% and 19.85%, respectively), which accounted for the main variance of the correlation among components, BMP, kinetic rate (k), results of enzymatic hydrolysis, FTIR and thermal analysis of all the samples (UT, A, CTL, F1 and F2) of the five biomasses.

PC 1 was mainly determined by lignin, BMP, kinetic rate (k) and ECD (Fig. 7A). It could be concluded that lignin content has a negative correlation with k significantly, with BMP and ECD in a lower extent. It is suggested that BMP should correlate more strongly with lignin than holocellulose. It seems that $898/1506\text{ cm}^{-1}$ should have also correlate with lignin content negatively, which is similar to the result that good correlation was found between the MIR band-height ratio ($1510/897\text{ cm}^{-1}$) and the lignin content ($r = 0.965$) (Schwanninger et al., 2004).

PC 2 was described principally by the results of FTIR, three ratios of intensities of $1050/1506$, $1375/1506$ and $1160/1506\text{ cm}^{-1}$, respectively. As can be seen from Fig. 7A, these three parameters were correlated strongly, which is as expected, since these three ratios of intensities all represent the sum of content of cellulose and hemicellulose against lignin content. As can be seen from the axis PC 3 (Fig. 7B), Ash is negatively correlated with the result R_2 from thermal analysis and the ratio of intensities of $1740/1506\text{ cm}^{-1}$.

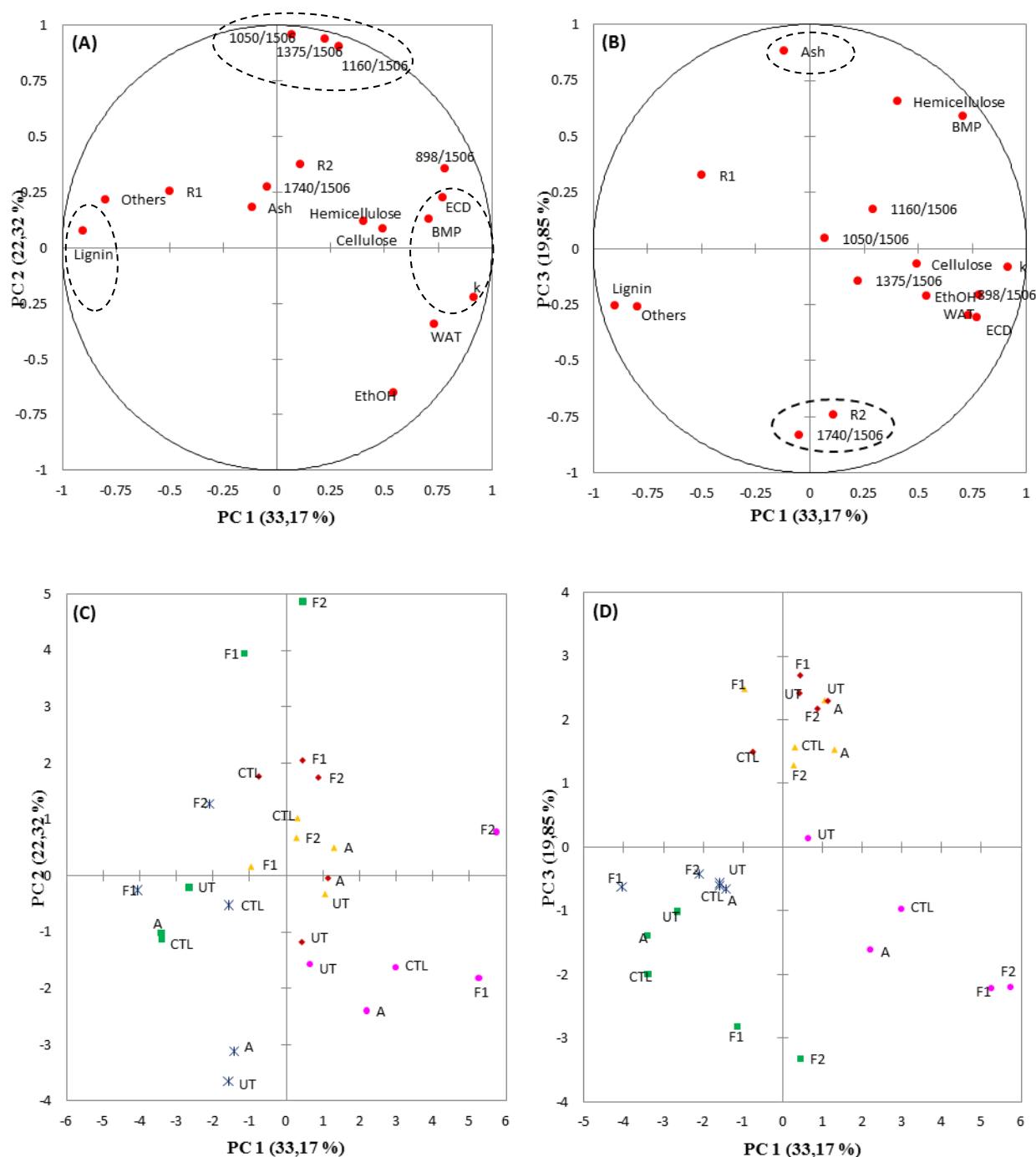


Fig. 7 Plot of the loadings of the variables (A and B) and samples scores (C and D) with principal components PC1×PC2 and PC1×PC3. Hazel (■), ACA (✕), Barley straw (▲), Wheat straw (◆) and Bagasse (●).

As can be seen from Fig. 7C and D, the samples of Barley straw and those of Wheat straw are positioned close to each other, which could indicate that to a certain extent the two straw samples are similar in terms of the composition and structural properties. Hazel and Bagasse are far away from each other, indicating that these two samples differ substantially, which confirms that *C. subvermispora* could improve the anaerobic biodegradability in a different way on different types of lignocellulosic biomass. F1 and F2 pretreated Hazel were far away from untreated, autoclaved and the control sample of Hazel along PC 2 and PC 3, which is due to that fungal pretreatment increased the ratios of intensities of FTIR and the ratio R_2 of thermal analysis significantly. Moreover, autoclaved and the control sample of Hazel were close to untreated Hazel, indicating that the parameters selected in our study of PCA could not show much the differences due to autoclave and incubation without fungi process on Hazel.

Regarding Acacia, F1 sample seems always to be far away from the other samples of Acacia (UT, A, CTL and F2), which could be probably due to the difference of BMP among the five Acacia samples. Equally, the differences of ratios of intensities of FTIR resulted in the distance of the five Acacia samples along PC 2. Regarding Bagasse, the differences of the five samples (UT, A, CTL, F1 and F2) along PC 1 could be explained by the significant increase of BMP kinetic rate k . And also, the changes of Bagasse due to autoclave and incubation without fungi process are showed through the distance among the untreated, autoclaved and the control sample of Bagasse. F1 and F2 pretreated Bagasse are far away from each other along PC 2, which is due to the differences of FTIR spectra, indicating F1 and F2 showed different metabolism even on the same lignocellulosic biomass.

IX.5. Conclusion

The results of FTIR and TG-DSC analyses concluded that fungal pretreatment could break down the linkages in the structure of lignocellulosic biomass, which is consistent with the chemical compositional results. The increase of thermal decomposition rate of fungal pretreated lignocellulose was observed resulting from loosened structure. It is proposed that the effects of fungal pretreatment depend on the type of lignocellulosic biomass. Moreover, two strains of *C. subvermispora* showed different metabolisms even on the same lignocellulosic biomass. Lignin content has a negative correlation with k significantly, with BMP and ECD in a lower extent.

Acknowledgment

We gratefully thank Professor Mme. C. Lapierre of Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA/AgroParisTech (France) for assistance with Thioacidolysis analyses.

IX.6. References

1. Achour, F. 2008. Caractérisation de la matière organique dans les ordures ménagères. Recherche d'indicateurs de stabilité. Thèse INSA de LYON, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon, Spécialité Sciences & Techniques du Déchet, pp 92-137.
2. Akhtar, M., Attridge, M.C., Myers, G.C., Blanchette, R.A. 1993. Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 47(1), 36-40.
3. Amirta, R., Tanabe, T., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M. 2006. Methane fermentation of Japanese cedar wood pretreated with a white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Biotechnol.*, 123(1), 71-77.
4. Barrasa, J.M., Blanco, M.N., Esteve-Raventós, F., Altés, A., Checa, J., Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J. 2014. Wood and humus decay strategies by white-rot basidiomycetes correlate with two different dye decolorization and enzyme secretion patterns on agar plates. *Fungal Genet. Biol.*, 72, 106-114.
5. Bayard, R., Gonzalez-Ramirez, L., Guendouz, J., Benbelkacem, H., Buffière, P., Gourdon, R. 2015. Statistical Analysis to Correlate Bio-physical and Chemical Characteristics of Organic Wastes and Digestates to Their Anaerobic Biodegradability. *Waste and Biomass Valorization*, 1-11.
6. Blanchette, R., Otjen, L., Effland, M., Eslyn, W. 1985. Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. *Wood science and technology*, 19(1), 35-46.
7. Blanchette, R.A., W. Krueger, E., Haight, J.E., Masood, A., Akin, D.E. 1997. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Biotechnol.*, 53(2-3), 203-213.

8. Caballero, J.A., Marcilla, A., Conesa, J.A. 1997. Thermogravimetric analysis of olive stones with sulphuric acid treatment. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 44(1), 75-88.
9. Chen, W.-H., Tu, Y.-J., Sheen, H.-K. 2010. Impact of dilute acid pretreatment on the structure of bagasse for bioethanol production. *International Journal of Energy Research*, 34(3), 265-274.
10. Dell'Abate, M., Benedetti, A., Sequi, P. 2000. Thermal methods of organic matter maturation monitoring during a composting process. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 61(2), 389-396.
11. Dell'Abate, M.T., Canali, S., Trinchera, A., Benedetti, A., Sequi, P. 1998. Thermal analysis in the evaluation of compost stability: a comparison with humification parameters. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51(3), 217-224.
12. Di Girolamo, G., Bertin, L., Capecchi, L., Ciavatta, C., Barbanti, L. 2014. Mild alkaline pre-treatments loosen fibre structure enhancing methane production from biomass crops and residues. *Biomass Bioenerg*, 71, 318-329.
13. Ding, S.-Y., Himmel, M.E. 2006. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. *J. Agric. Food Chem.*, 54(3), 597-606.
14. Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., Menardo, S. 2010. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresour. Technol.*, 101(10), 3780-3783.
15. Dong, X.Q., Yang, J.S., Zhu, N., Wang, E.T., Yuan, H.L. 2013. Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. *Bioresour. Technol.*, 131, 443-451.
16. Dorado, J., Almendros, G., Camarero, S., Martínez, A.T., Vares, T., Hatakka, A. 1999. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.*, 25(7), 605-612.
17. El Ouaquodi, F.Z., El Fels, L., Lemée, L., Amblès, A., Hafidi, M. 2015. Evaluation of lignocellulose compost stability and maturity using spectroscopic (FTIR) and thermal (TGA/TDA) analysis. *Ecol. Eng.*, 75, 217-222.

18. El Ouaquoudi, F.Z., El Fels, L., Winterton, P., Lemée, L., Amblès, A., Hafidi, M. 2014. Study of Humic Acids during Composting of Ligno-Cellulose Waste by Infra-Red Spectroscopic and Thermogravimetric/Thermal Differential Analysis. *Compost Sci. Util.*, 22(3), 188-198.
19. Faix, O., Bremer, J., Schmidt, O., Tatjana, S.J. 1991. Monitoring of chemical changes in white-rot degraded beech wood by pyrolysis—gas chromatography and Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 21(1), 147-162.
20. Fang, J.-J., Yang, N., Cen, D.-Y., Shao, L.-M., He, P.-J. 2012. Odor compounds from different sources of landfill: Characterization and source identification. *Waste Management*, 32(7), 1401-1410.
21. Fengel, D., Wegener, G. 1983. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
22. Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Floudas, D., Hibbett, D.S., Canessa, P., Larrondo, L.F., James, T.Y., Seelenfreund, D., Lobos, S., Polanco, R., Tello, M., Honda, Y., Watanabe, T., Ryu, J.S., Kubicek, C.P., Schmoll, M., Gaskell, J., Hammel, K.E., St John, F.J., Vanden Wymelenberg, A., Sabat, G., Splinter BonDurant, S., Syed, K., Yadav, J.S., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lavin, J.L., Oguiza, J.A., Perez, G., Pisabarro, A.G., Ramirez, L., Santoyo, F., Master, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Lombard, V., Magnuson, J.K., Kues, U., Hori, C., Igarashi, K., Samejima, M., Held, B.W., Barry, K.W., LaButti, K.M., Lapidus, A., Lindquist, E.A., Lucas, S.M., Riley, R., Salamov, A.A., Hoffmeister, D., Schwenk, D., Hadar, Y., Yarden, O., de Vries, R.P., Wiebenga, A., Stenlid, J., Eastwood, D., Grigoriev, I.V., Berka, R.M., Blanchette, R.A., Kersten, P., Martinez, A.T., Vicuna, R., Cullen, D. 2012. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(14), 5458-63.
23. Fernández, J.M., Plaza, C., Polo, A., Plante, A.F. 2012. Use of thermal analysis techniques (TG–DSC) for the characterization of diverse organic municipal waste streams to predict biological stability prior to land application. *Waste Management*, 32(1), 158-164.

24. Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J. 2000. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresour. Technol.*, 74(3), 201-212.
25. Franceschi, E., Cascone, I., Nole, D. 2008. Thermal, XRD and spectrophotometric study on artificially degraded woods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 91(1), 119-123.
26. Gandolfi, S., Ottolina, G., Riva, S., Fantoni, G.P., Patel, I. 2013. Complete Chemical Analysis of Carmagnola Hemp Hurds and Structural Features of Its Components.
27. Gastaldi, G., Capretti, G., Focher, B., Cosentino, C. 1998. Characterization and proprieties of cellulose isolated from the *Crambe abyssinica* hull. *Industrial Crops and Products*, 8(3), 205-218.
28. Heitner, C., Dimmel, D., Schmidt, J. 2010. Lignin and lignans: advances in chemistry. CRC press, pp. 495-512.
29. Hurtubise, F.G., Krassig, H. 1960. Classification of Fine Structural Characteristics in Cellulose by Infared Spectroscopy. Use of Potassium Bromide Pellet Technique. *Analytical Chemistry*, 32(2), 177-181.
30. ISO, E. 1998. 11734: 1998–Water quality–Evaluation of the „ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge–Method by measurement of the biogas production (ISO 11734: 1995). German version: DIN EN ISO, 11734.
31. ISO, N. 1994. 11465. Qualité du sol—Détermination de la teneur pondérale en matiere seche et en eau. Méthode gravimétrique. AFNOR.
32. Jonsson, L., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels*, 6(1), 16.
33. Krishania, M., Vijay, V.K., Chandra, R. 2013. Methane fermentation and kinetics of wheat straw pretreated substrates co-digested with cattle manure in batch assay. *Energy*, 57, 359-367.
34. Lapierre, C., Pollet, B., Rolando, C. 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res. Chem. Intermed.*, 21(3-5), 397-412.
35. Li, H., McDonald, A.G. 2014. Fractionation and characterization of industrial lignins. *Industrial Crops and Products*, 62, 67-76.

36. Li, Y., Li, J., Deng, C. 2014. Occurrence, characteristics and leakage of polybrominated diphenyl ethers in leachate from municipal solid waste landfills in China. *Environ. Pollut.*, 184, 94-100.
37. Liang, C., Marchessault, R. 1959. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. II. Native celluloses in the region from 640 to 1700 cm.⁻¹. *Journal of Polymer Science*, 39(135), 269-278.
38. Liew, L.N., Shi, J., Li, Y. 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass Bioenerg*, 46, 125-132.
39. Liu, L., Qian, C., Jiang, L., Yu, H.-Q. 2014. Direct Three-Dimensional Characterization and Multiscale Visualization of Wheat Straw Deconstruction by White Rot Fungus. *Environ. Sci. Technol.*, 48(16), 9819-9825.
40. Liu, X., Bayard, R., Benbelkacem, H., Buffière, P., Gourdon, R. 2015. Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics. *Biomass Bioenerg*, 81, 534-543.
41. Malutan, T., Nicu, R., Popa, V.I. 2008. Contribution to the study of hydroxymetylation reaction of alkali lignin. *BioResources*, 3(1), 13-20.
42. Malutan, T., Nicu, R., Popa, V.I. 2007. CONTRIBUTION TO THE STUDY OF HYDROXYMETYLATION REACTION OF ALKALI LIGNIN.
43. Metzger, J., Hüttermann, A. 2009. Sustainable global energy supply based on lignocellulosic biomass from afforestation of degraded areas. *Naturwissenschaften*, 96(2), 279-288.
44. Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., Carrère, H. 2013. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3), 260-322.
45. Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X.M., Latrille, E., Trably, E., Steyer, J.-P., Carrere, H.I.n. 2012. Predictive models of biohydrogen and biomethane production based on the compositional and structural features of lignocellulosic materials. *Environ. Sci. Technol.*, 46(21), 12217-12225.

46. Monlau, F., Sambusiti, C., Ficara, E., Aboulkas, A., Barakat, A., Carrere, H. 2015. New opportunities for agricultural digestate valorization: current situation and perspectives. *Energy & Environmental Science*, 8(9), 2600-2621.
47. Nelson, M.L., O'Connor, R.T. 1964. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *J. Appl. Polym. Sci.*, 8(3), 1325-1341.
48. Ni, Z., Liu, J., Song, M., Wang, X., Ren, L., Kong, X. 2015. Characterization of odorous charge and photochemical reactivity of VOC emissions from a full-scale food waste treatment plant in China. *Journal of Environmental Sciences*, 29, 34-44.
49. Pandey, K.K., Pitman, A.J. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(3), 151-160.
50. Plante, A.F., Fernández, J.M., Leifeld, J. 2009. Application of thermal analysis techniques in soil science. *Geoderma*, 153(1), 1-10.
51. Puentes, C., Norambuena, M., Mendonça, R.T., Elissetche, J.P., Freer, J. 2012. BIODEGRADATION OF EUCALYPTUS GLOBULUS AND E. NITENS BY THE WHITE-ROT FUNGUS CERIPORIOPSIS SUBVERMISPORA AND LIGNIN CHARACTERIZATION BY THIOACIDOLYSIS AND CuO OXIDATION. *WOOD RESEARCH*, 57(1), 91-100.
52. Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T. 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311(5760), 484-489.
53. Rana, R., Langenfeld-Heyser, R., Finkeldey, R., Polle, A. 2010. FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterisation of wood and lignin of five tropical timber wood species of the family of Dipterocarpaceae. *Wood science and technology*, 44(2), 225-242.
54. Reh, U., Kraepelin, G., Lamprecht, I. 1987. Differential scanning calorimetry as a complementary tool in wood biodegradation studies. *Thermochimica Acta*, 119(1), 143-150.

55. Reh, U., Kraepelin, G., Lamprecht, I. 1986. Use of differential scanning calorimetry for structural analysis of fungally degraded wood. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(5), 1101-1106.
56. Rowell, R.M. 1992. Opportunities for lignocellulosic materials and composites. ACS Publications.
57. Sanchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, 27(2), 185-94.
58. Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A. 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy & Environmental Science*, 4(4), 1306-1310.
59. Schwanninger, M., Hinterstoisser, B., Gradinger, C., Messner, K., Fackler, K. 2004. Examination of spruce wood biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispora* using near and mid infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc*, 12(6), 397-409.
60. Selig, M., Weiss, N., Ji, Y. 2008. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. National Renewable Energy Laboratory.
61. Shi, J., Sharma-Shivappa, R.R., Chinn, M.S. 2012. Interactions between fungal growth, substrate utilization and enzyme production during shallow stationary cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* on cotton stalks. *Enzyme Microb. Technol.*, 51(1), 1-8.
62. Sipponen, M.H., Lapierre, C., Mechin, V., Baumberger, S. 2013. Isolation of structurally distinct lignin-carbohydrate fractions from maize stem by sequential alkaline extractions and endoglucanase treatment. *Bioresour. Technol.*, 133, 522-8.
63. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure.
64. Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2005. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), 1617.
65. Smidt, E., Tintner, J. 2007. Application of differential scanning calorimetry (DSC) to evaluate the quality of compost organic matter. *Thermochimica Acta*, 459(1–2), 87-93.

66. Stewart, D., Wilson, H.M., Hendra, P.J., Morrison, I.M. 1995. Fourier-Transform Infrared and Raman Spectroscopic Study of Biochemical and Chemical Treatments of Oak Wood (*Quercus rubra*) and Barley (*Hordeum vulgare*) Straw. *J. Agric. Food Chem.*, 43(8), 2219-2225.
67. Tanaka, H., Koike, K., Itakura, S., Enoki, A. 2009. Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.*, 45(5), 384-390.
68. Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Tanaka, T. 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J. Biosci. Bioeng.*, 100(6), 637-43.
69. Triolo, J.M., Pedersen, L., Qu, H., Sommer, S.G. 2012. Biochemical methane potential and anaerobic biodegradability of non-herbaceous and herbaceous phytomass in biogas production. *Bioresour. Technol.*, 125, 226-232.
70. Tsujiyama, S.-i., Miyamori, A. 2000. Assignment of DSC thermograms of wood and its components. *Thermochimica Acta*, 351(1-2), 177-181.
71. Vivekanand, V., Olsen, E.F., Eijssink, V.G.H., Horn, S.J. 2013. Effect of different steam explosion conditions on methane potential and enzymatic saccharification of birch. *Bioresour. Technol.*, 127(0), 343-349.
72. Wan, C., Li, Y. 2011. Effectiveness of microbial pretreatment by *Ceriporiopsis subvermispora* on different biomass feedstocks. *Bioresour. Technol.*, 102(16), 7507-12.
73. Wan, C., Li, Y. 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.*, 30(6), 1447-57.
74. Wan, C., Li, Y. 2010. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme Microb. Technol.*, 47(1-2), 31-36.
75. Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C. 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12-13), 1781-1788.
76. Yang, X., Zeng, Y., Ma, F., Zhang, X., Yu, H. 2010. Effect of biopretreatment on thermogravimetric and chemical characteristics of corn stover by different white-rot fungi. *Bioresour. Technol.*, 101(14), 5475-9.

77. Yu, H., Guo, G., Zhang, X., Yan, K., Xu, C. 2009. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. *Bioresour. Technol.*, 100(21), 5170-5175.
78. Yu, H., Liu, F., Ke, M., Zhang, X. 2015. Thermogravimetric analysis and kinetic study of bamboo waste treated by *Echinodontium taxodii* using a modified three-parallel-reactions model. *Bioresour. Technol.*, 185, 324-330.
79. Zeng, J., Singh, D., Chen, S. 2011. Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts. *Bioresour. Technol.*, 102(3), 3206-14.
80. Zhang, J., Feng, L., Wang, D., Zhang, R., Liu, G., Cheng, G. 2014. Thermogravimetric analysis of lignocellulosic biomass with ionic liquid pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 153, 379-382.
81. Zhang, X., Yu, H., Huang, H., Liu, Y. 2007. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(3), 159-164.
82. Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 88(7), 797-824.
83. Zhao, J., Ge, X., Vasco-Correa, J., Li, Y. 2014. Fungal pretreatment of unsterilized yard trimmings for enhanced methane production by solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.*, 158, 248-52.

X. Conclusions générales et Perspectives

X.1. Conclusions générales

L'objectif de cette étude est, d'une part, de caractériser des résidues lignocellulosiques divers, purs ou mixtes, évaluer leur potentiel de biométhane, ainsi que trouver les corrélations entre les paramètres différents pour prédire leur BMP, d'autre part, de réaliser le prétraitement fongique sur les 5 biomasses sélectionnées pour améliorer leur BMP.

Les caractérisations variées des résidues lignocellulosiques et l'analyse statistique de ces résultats ont montré que les corrélations linéaires entre BMP et résultat de caractérisation spécifique ou combinaisons de plusieurs existent. Dont, celle entre BMP et la teneur de lignine ou RES est assez importante, $r^2 = 0.71$ pour les 36 résidues lignocellulosiques purs ou mixtes (BMP & RES), $r^2 = 0.80$ pour les 14 biomasses sylvicoles et agricoles (BMP & Lignine) et $r^2 = 0.64$ pour les 5 biomasses subis différents traitements (BMP & Lignine), y compris l'autoclavage, l'incubation sans champignon et le prétraitement fongique avec deux souches de *Ceriporiopsis subvermispota*. Malgré tout, une étude plus approfondie est nécessaire pour prédire BMP.

Les résultats de prétraitement fongique sur les 5 biomasses ont montré que le champignon de pourriture blanche *Ceriporiopsis subvermispota* réagit différemment entre biomasse. L'accessibilité de cellulose de biomasse est le facteur crucial que ses teneurs de polysaccharide et lignine pour l'effet de prétraitement fongique. Faible accessibilité de cellulose de biomasse peut stimuler la dégradation de lignine, que le « vrai récalcitrant » Noisetier ou le « fause récalcitrant » Bagasse. Pour certaines biomasses, le prétraitement fongique avec le champignon ce présent peut effectivement augmenter la production de méthane ou le coefficient de cinétique significativement. Il a la capacité de dégradation sélective de lignine sur certaines biomasses, et en même temps, celle de dégradation non-sélective de polysaccharide sur certaines biomasses. De plus, pour les deux souches de ce champignon, ils peuvent montrer leurs métabolismes différents sur le même biomasse. Des fois, la tendance d'évolution d'hydrolyse enzymatique est en conformité totalement avec celle de BMP. Les résultats de compositions et ceux des analyses structurales des échantillons (initiaux, autoclavé, contrôle, prétraité par F1 ou F2) de chaque biomasse ont montré que la structure peut être modifiée beaucoup malgré les compositions ne changent pas significativement.

X.2. Perspectives

1. Prétraitement fongique

-Les sucres dans la surface de Bagasse peut-être pourraient favoriser la dégradation de lignin du champignon en fournissant la source de carbone, mais en même temps, l'insuffisance des sucres pourrait aussi stimuler la dégradation de lignin du champignon. Donc, pour certaines matrices (ex. Noisetier et Bagasse) dans lesquelles l'effet de prétraitement fongique sont évidents, ajouter des

substances nutritives dans la culture de champignon pour améliorer la pousse de champignon, par exemple, le son de blé, la liqueur de trempage de maïs, etc. ou des éléments métaux (Mn, Cu, Fe, etc.).

-Mélanger deux ou plus sortes de biomasses avec différentes ratios, puisque le champignon peut montrer l'effet sélective de dégradation de lignine sur certaine matrices et pas sur d'autres. Donc, mélange de biomasses, par exemple, Noisetier et Paille d'orge, pourrait peut-être améliorer le processus de dégradation de lignine et donc augmenter la production de méthane de deux matrices ensemble.

-Mesurer la masse de champignon après le prétraitement, car le mycélium de champignon peut produire méthane donc interférer avec la production de méthane de seule biomasse lignocellulosique.

Caractérisation profonde de MnP et de Laccase de *Ceriporiopsis subvermispora*, par exemple, le potentiel redox, la spécificité de substrat, etc., pour induire la production d'enzymes ligninolytic et pour savoir les facteurs dans les matrices qui influencent la sécrétion d'enzymes.

-Mesurer la production de l'OH \cdot pendant le processus prétraitement fongique.

-Effectuer les essais cinétiques pour savoir la tendance de production d'enzyme, car c'est possible que les activités d'enzyme puissent être détectés avant 28 j.

-Etudier la balance énergétique pendant le processus prétraitement. Contribution énergétique : culture de champignon dan l'incubateur, l'autoclavage. Sortie énergétique : l'augmentation de production de méthane.

2. Caractérisations de biomasse lignocellulosique

-Caractérisations profonde sur la structure de biomasse jusqu'au niveau de structure de molécule, par exemple, les manières de liaisons ou bandes dans le lignine et ceux entre lignine et carbohydrates, pour trouver les différences entre différente types de biomasses et les raisons pour lesquelles la dégradation sélective de lignine sont importante.

-Caractérisation structurale des matrices (initiaux, autoclavés, incubations sans inoculation, traités par deux champignons) avec la microscopie électronique à balayage (Scanning Electron Microscopy) et avec le thioacidolyse pour savoir les trois types d'unités de lignine.

-Caractérisations sur les fractions d'extractifs solubles dans l'eau et dans l'éthanol avec spectrométrie de masse.

3. BMP

-Etudier l'acclimatation de boues anaérobies et la stabilisation de propriétés de boues anaérobies.

Références bibliographiques

- Abbas, A., Ansumali, S. 2010. Global potential of rice husk as a renewable feedstock for ethanol biofuel production. *Bioenergy Research*, **3**(4), 328-334.
- ACI Committee 232, 1996. Use of Fly Ash in Concrete, ACI 232.2R-96. American Concrete Institute, Farmington Hills, Michigan, pp. 34.
- Adamiec P., Bénézet J.C., Benhassaine A, 2005. Relation entre une cendre volante silico-alumineuse et son charbon. *Poudres & Grains*, Volume 15, Issue 3, pp. 35-46.
- ADEME, 2007. Boues résiduelles de station d'épuration [En ligne]. Disponible sur « <http://guide.sindra.org/index.php/site/guide/menages/bouesresiduellesstationepuration#> » (consulté le 23.01.2011).
- Adler, E. 1977. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood science and technology*, **11**(3), 169-218.
- AFNOR NF X31-151 : Qualité des sols - sols, sédiments, boues de station d'épuration
- Akin, D., Sethuraman, A., Morrison, W., Martin, S., Eriksson, K.-E. 1993. Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(12), 4274-4282.
- Akin, D.E., Morrison Iii, W.H., Rigsby, L.L., Gamble, G.R., Sethuraman, A., Eriksson, K.E.L. 1996. Biological delignification of plant components by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **63**(1-4), 305-321.
- Allen, S.G., Schulman, D., Lichwa, J., Antal, M.J., Laser, M., Lynd, L.R. 2001. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **40**(13), 2934-2941.
- Alves, E.F., Bose, S.K., Francis, R.C., Colodette, J.L., Iakovlev, M., Van Heiningen, A. 2010. Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. *Carbohydrate Polymers*, **82**(4), 1097-1101.
- Amirta, R., Tanabe, T., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. 2006. Methane fermentation of Japanese cedar wood pretreated with a white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Biotechnol.*, **123**(1), 71-77.
- Aswathy, U., Sukumaran, R.K., Devi, G.L., Rajasree, K., Singhanian, R.R., Pandey, A. 2010. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresour. Technol.*, **101**(3), 925-930.
- Atalla, R.H., Vanderhart, D.L. 1984. Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Science*, **223**(4633), 283-285.
- Baba, Y., Tanabe, T., Shirai, N., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T. 2011. Pretreatment of Japanese cedar wood by white rot fungi and ethanolysis for bioethanol production. *Biomass Bioenerg.*, **35**(1), 320-324.
- Baldrian, P., Valášková, V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**(3), 501-521.

- Barlaz, M.A. 1996. *Microbiology of solid waste landfills*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H., Vavilin, V. 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1(ADM 1). *Water Sci. Technol.*, **45**(10), 65-73.
- Bayard, R. & Gourdon, R. (2010). Traitement Biologique des Déchets. Techniques de l'Ingénieur, Génie des Procédés, 42 (J 129), J3966/1-J3966/26.
- Bidlingmaier, W., Sidaine, J.-M., Papadimitriou, E. 2004. Separate collection and biological waste treatment in the European Community. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **3**(4), 307-320.
- Blanchette, R.A., W. Krueger, E., Haight, J.E., Masood, A., Akin, D.E. 1997. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Biotechnol.*, **53**(2-3), 203-213.
- Boisset, C., Chanzy, H., Henrissat, B., LAMED, R., SHOHAM, Y., Bayer, E. 1999. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. *Biochem. J.*, **340**, 829-835.
- Brylev, A., Adylov, D., Tukhtaeva, G., Kamal'dinova, N., Abidova, L., Rakhimov, D. 2001. Polysaccharides of rice straw. *Chemistry of natural compounds*, **37**(6), 569-570.
- Buffière, P., Bayard, R., Germain, P., 2009. Freins au développement de la filière biogaz : les besoins en recherche et développement. ETUDE RECORD N° 07-0418/1A. Rapport final. pp. 92.
- Buffiere, P., Delgadillo Mirquez, L., Steyer, J.P., Bernet, N., Delgenes, J.P. 2008. Anaerobic digestion of solid wastes needs research to face an increasing industrial success. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, **6**(1).
- Call, H., Mücke, I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *J. Biotechnol.*, **53**(2), 163-202.
- Cao, N., Xia, Y., Gong, C.S., Tsao, G.T. 1997. Production of 2, 3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulase. in: *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Springer, pp. 129-139.
- Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J.M., Sáez, F., Castro, E. 2008. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.*, **99**(6), 1869-1876.
- Chandler, J.A., Jewell, W.J., Gossett, J., Van Soest, P., Robertson, J. 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. *Biotechnol. Bioeng. Symp.:(United States)*. Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T. 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew Sust Energ Rev*, **16**(3), 1462-1476.
- Chynoweth, D., Turick, C., Owens, J., Jerger, D., Peck, M. 1993. Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass Bioenerg*, **5**(1), 95-111.
- Chynoweth, D.P., Owens, J.M., Legrand, R. 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*, **22**(1), 1-8.

- Chynoweth, D.P., Pullammanappallil, P. 1996. Anaerobic digestion of municipal solid wastes. *Microbiology of solid waste*, 71-113.
- CSTB, 2010. Etude de la faisabilité technique, économique, environnementale et sanitaire de l'utilisation de résidus de traitement thermique de boues comme MPS pour le BTP - Application aux résidus des procédés thermiques de traitement des boues d'épuration (incinération). Rapport Programme RASH², 11p.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **1**(1), 36-50.
- Davidsson, Å., Gruvberger, C., Christensen, T.H., Hansen, T.L., la Cour Jansen, J. 2007. Methane yield in source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Waste Management*, **27**(3), 406-414.
- De Baere, L. 2006. Will anaerobic digestion of solid waste survive in the future? *Water Sci. Technol.*, **53**(8), 187-194.
- Dekker, R.F.H. 1985. Biodegradation of the Hemicelluloses. in: *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*; (Ed.) T. Higuchi, Academic Press, pp. 505-533.
- Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S.M., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A.M., Evtuguin, D.V., Bezerra, R.M.F. 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.*, **101**(15), 6045-6050.
- Dunster M.A., 2007. Characterization of mineral wastes, resources and processing technologies-integrated waste management for the production of construction material - Case Study: Incinerated sewage sludge ash (ISSA) in autoclaved aerated concrete (AAC).
- Dwivedi, P., Alavalapati, J.R.R., Lal, P. 2009. Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. *Energy for Sustainable Development*, **13**(3), 174-182.
- EN 12920 : Caractérisation des déchets - Méthodologie pour la détermination du comportement à la lixiviation d'un déchet dans des conditions spécifiées.
- EPA, 2011. Guide for industrial waste management – Chapter 2 : Characterizing waste [En ligne]. Disponible sur « <http://www.epa.gov/osw/nonhaz/industrial/guide/chap2s.htm> » (consulté le 25.01.2012)
- EurObserv'ER, 2013 -http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/barobilan/barobilan13-fr.pdf.
- Eurostat, 2011e. Composting of sewage sludge from urban wastewater [En ling]. Disponible sur « <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/refreshTableAction.do?tab=table&plugin=0&pcode=ten00032&language=en> » (consulté le 23.01.2012).
- Eurostat, 2011f. Other methods of disposal of sewage sludge from urban wastewater [En ligne]. Disponible sur « <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/refreshTableAction.do?tab=table&plugin=0&pcode=ten00035&language=en> » (consulté le 23.01.2012).

- Fan, L., Lee, Y.-H., Gharpuray, M. 1982. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. in: *Microbial reactions*, Springer, pp. 157-187.
- Fengel, D., Wegener, G. 1983. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
- Fontes C.M.A., Barbosa M.C., Toledo Filho R.D., Goncalves J.P., 2004. Potentiality of sewage sludge
- Frederick, W., Lien, S., Courchene, C., DeMartini, N., Ragauskas, A., Iisa, K. 2008. Co-production of ethanol and cellulose fiber from Southern Pine: A technical and economic assessment. *Biomass Bioenerg*, **32**(12), 1293-1302.
- Frigon, J.C., Guiot, S.R. 2010. Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **4**(4), 447-458.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer. pp. 278-288.
- Gardiner, E.S., Sarko, A. 1985. Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. 16. The crystal structures of celluloses IVI and IVII. *Canadian journal of chemistry*, **63**(1), 173-180.
- Ghosh, A., Bhattacharyya, B. 1999. Biomethanation of white rotted and brown rotted rice straw. *Bioprocess engineering*, **20**(4), 297-302.
- Grohmann, K., Torget, R., Himmel, M. 1986. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnology and bioengineering symposium*. Wiley. pp. 59-80.
- Guerra, A., Mendonça, R., Ferraz, A. 2003. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.*, **33**(1), 12-18.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 1992. Substrate specificity and properties of the aryl - alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.*, **209**(2), 603-611.
- Gunaseelan, V.N. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass Bioenerg*, **26**(4), 389-399.
- Hariharan, S., Nambisan, P. 2012. Optimization of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and lac production from *Ganoderma lucidum* under solid state fermentation of pineapple leaf. *BioResources*, **8**(1), 250-271.
- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., Bakker, R. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass.
- Harreither, W., Sygmund, C., Augustin, M., Narciso, M., Rabinovich, M.L., Gorton, L., Haltrich, D., Ludwig, R. 2011. Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**(5), 1804-1815.
- Harreither, W., Sygmund, C., Dunhofen, E., Vicuna, R., Haltrich, D., Ludwig, R. 2009. Cellobiose dehydrogenase from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(9), 2750-7.
- Hashimoto, A.G. 1986. Pretreatment of wheat straw for fermentation to methane. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**(12), 1857-1866.

- Heidorne, F.O., Magalhães, P.O., Ferraz, A.L., Milagres, A.M.F. 2006. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, **38**(3-4), 436-442.
- Heitner, C., Dimmel, D., Schmidt, J. 2010. *Lignin and lignans: advances in chemistry*. CRC press, pp. 495-512.
- Hendriks, A., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, **100**(1), 10-18.
- Henriksson, G., Johansson, G., Pettersson, G. 2000a. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.*, **78**(2), 93-113.
- Henriksson, G., Zhang, L., Li, J., Ljungquist, P., Reitberger, T., Pettersson, G., Johansson, G. 2000b. Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1480**(1), 83-91.
- Herrera, A., Téllez-Luis, S., Ramirez, J., Vázquez, M. 2003. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. *Journal of Cereal Science*, **37**(3), 267-274.
- Hildén, L., Johansson, G., Pettersson, G., Li, J., Ljungquist, P., Henriksson, G. 2000. Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? *FEBS letters*, **477**(1), 79-83.
- Howard, R., Abotsi, E., Van Rensburg, E.J., Howard, S. 2004. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, **2**(12), 602-619.
- Hyde, S.M., Wood, P.M. 1997. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe (III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe (II) oxidation at a distance from the hyphae. *Microbiology*, **143**(1), 259-266.
- Jeffries, T.W. 1991. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. in: *Physiology of Biodegradative Microorganisms*, Springer, pp. 163-176.
- Jeffries, T.W. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. in: *Biochemistry of microbial degradation*, Springer, pp. 233-277.
- Jeon, Y., Xun, Z., Rogers, P. 2010. Comparative evaluations of cellulosic raw materials for second generation bioethanol production. *Lett. Appl. Microbiol.*, **51**(5), 518-524.
- Jimenez, S., Cartagena, M.C., Arce, A. 1990. Influence of lignin on the methanization of lignocellulosic wastes. *Biomass*, **21**(1), 43-54.
- Kim, T.H., Taylor, F., Hicks, K.B. 2008. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresour. Technol.*, **99**(13), 5694-5702.
- Kremer, S.M., Wood, P.M. 1992. Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.*, **208**(3), 807-814.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E. 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.*, **100**(17), 3948-3962.

- Lapierre, C. 2010. Determining lignin structure by chemical degradations. *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*, C. Heitner, D. Dimmel, and JA Schmidt, eds (Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group), 11-48.
- Liew, L.N., Shi, J., Li, Y. 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass Bioenerg*, **46**, 125-132.
- Lobos, S., Larraín, J., Salas, L., Cullen, D., Vicuña, R. 1994. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology*, **140**(10), 2691-2698.
- Mace, S., Bolzonella, D., Cecchi, F., Mata-Alvarez, J. 2003. Comparison of the biodegradability of the grey fraction of municipal solid waste of Barcelona in mesophilic and thermophilic conditions. *Water Sci. Technol.*, **48**(4), 21-28.
- Magalhães, P.O., Ferraz, A., Milagres, A.F.M. 2006. Enzymatic properties of two β -glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions. *J. Appl. Microbiol.*, **101**(2), 480-486.
- Malherbe, S., Cloete, T.E. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **1**(2), 105-114.
- Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, Martinez MJ, Gutierrez A and del Rio JC. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 2005; 8: 195-204.
- Mata-Alvarez, J., Mace, S., Llabres, P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.*, **74**(1), 3-16.
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour. Technol.*, **83**(1), 37-46.
- Menon, V., Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**(4), 522-550.
- Miron, J., Yosef, E., Ben-Ghedalia, D. 2001. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. *J. Agric. Food Chem.*, **49**(5), 2322-2326.
- Monlau, F., Latrille, E., Da Costa, A.C., Steyer, J.-P., Carrère, H. 2013. Enhancement of methane production from sunflower oil cakes by dilute acid pretreatment. *Applied Energy*, **102**(0), 1105-1113.
- Monsalve G., J.F., Medina De Perez, V.I., Ruiz Colorado, A.A. 2006. PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA CÁSCARA DE BANANO Y DE ALMIDÓN DE YUCA. *Dyna*, **73**, 21-27.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, **96**(6), 673-686.
- Mtui, G.Y. 2009. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology*, **8**(8).
- Nigam, J. 2002. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *J. Biotechnol.*, **97**(2), 107-116.

- Noike, T., Endo, G., Chang, J.E., Yaguchi, J.I., Matsumoto, J.I. 1985. Characteristics of carbohydrate degradation and the rate - limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**(10), 1482-1489.
- Novikova, L., Medvedeva, S., Volchatova, I., Bogatyreva, S. 2002. Changes in macromolecular characteristics and biological activity of hydrolytic lignin in the course of composting. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **38**(2), 181-185.
- O'Sullivan, 1997, <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2004/P520.pdf>. (consulté le 16-10-2015)
- O'Sullivan, A.C. 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, **4**(3), 173-207.
- Owens, J., Chynoweth, D. 1993. Biochemical methane potential of municipal solid waste (MSW) components. *Water Sci. Technol.*, **27**(2), 1-14.
- Palonen, H., Viikari, L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.*, **86**(5), 550-557.
- Pavlostathis, S., Giraldo-Gomez, E. 1991. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **21**(5-6), 411-490.
- Pereira, H. 1988. Variability in the chemical composition of plantation eucalypts (*Eucalyptus globulus* Labill.). *Wood and Fiber Science*, **20**(1), 82-90.
- Petersson, A., Thomsen, M.H., Hauggaard-Nielsen, H., Thomsen, A.-B. 2007. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass Bioenerg.*, **31**(11), 812-819.
- Pinto, P.A., Dias, A.A., Fraga, I., Marques, G., Rodrigues, M.A.M., Colaço, J., Sampaio, A., Bezerra, R.M.F. 2012. Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment. *Bioresour. Technol.*, **111**(0), 261-267.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, **50**(1), 1-39.
- Reguant, J., Rinaudo, M. 2000. Fibres Lignocellulosiques. En *Iniciation á la Chimie et á la Physico-Chimie Macromoleculaires. Les polymères naturels: structure, modifications, applications*, **13**.
- Rowell, R.M., Schultz, T.P., Narayan, R. 1992. *Emerging technologies for materials and chemicals from biomass*. ACS Publications.
- Rubio, M., Tortosa, J.F., Quesada, J., Gómez, D. 1998. Fractionation of lignocellulosics. Solubilization of corn stalk hemicelluloses by autohydrolysis in aqueous medium. *Biomass Bioenerg.*, **15**(6), 483-491.
- Sanchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, **27**(2), 185-94.
- Sasaki, C., Takada, R., Watanabe, T., Honda, Y., Karita, S., Nakamura, Y. 2011. Surface carbohydrate analysis and bioethanol production of sugarcane bagasse pretreated with the white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora* and microwave hydrothermolysis. *Bioresour. Technol.*, **102**(21), 9942-6.
- Schell, D.J., Ruth, M.F., Tucker, M.P. 1999. Modeling the enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated Douglas fir. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **77**(1-3), 67-81.

- Sethuraman, A., Akin, D.E., Eriksson, K.-E.L. 1998. Plant-Cell-Wall-Degrading Enzymes Produced by the White-Rot Fungus *Ceriporiopsis Subvermispora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **27**(1), 37-47.
- Singh, R., Varma, A., Laxman, R.S., Rao, M. 2009. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulase. *Bioresour. Technol.*, **100**(24), 6679-6681.
- Siriwongrungson, V., Zeng, R.J., Angelidaki, I. 2007. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water Res.*, **41**(18), 4204-4210.
- Stewart, D., Azzini, A., Hall, A.T., Morrison, I.M. 1997. Sisal fibres and their constituent non-cellulosic polymers. *Industrial Crops and Products*, **6**(1), 17-26.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, **83**(1), 1-11.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci*, **9**(9), 1621-51.
- Tanaka, H., Koike, K., Itakura, S., Enoki, A. 2009. Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.*, **45**(5), 384-390.
- Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Tanaka, T. 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**(6), 637-43.
- ten Have, R., Teunissen, P.J. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemical Reviews*, **101**(11), 3397-3414.
- Tong, X., Smith, L.H., McCarty, P.L. 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, **21**(4), 239-255.
- Torget, R., Teh-An, H. 1994. Two-temperature dilute-acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **45**(1), 5-22.
- Tuyen, V.D., Cone, J.W., Baars, J.J.P., Sonnenberg, A.S.M., Hendriks, W.H. 2012. Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. *Bioresour. Technol.*, **111**(0), 336-342.
- Vavilin, V., Rytov, S., Lokshina, L.Y. 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresour. Technol.*, **56**(2), 229-237.
- Vázquez, M., Oliva, M., Tellez-Luis, S.J., Ramírez, J.A. 2007. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresour. Technol.*, **98**(16), 3053-3060.
- Védrenne, F. 2007. Etude des processus de dégradation anaérobie et de production de méthane au cours du stockage des lisiers, Rennes, ENSA.
- Veeken, A., Hamelers, B. 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresour. Technol.*, **69**(3), 249-254.
- Wan, C., Li, Y. 2010. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme Microb. Technol.*, **47**(1-2), 31-36.

- Wan, C., Li, Y. 2011a. Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks. *Bioresour. Technol.*, **102**(20), 9788-9793.
- Wan, C., Li, Y. 2011b. Effectiveness of microbial pretreatment by *Ceriporiopsis subvermispora* on different biomass feedstocks. *Bioresour. Technol.*, **102**(16), 7507-7512.
- Wan, C., Li, Y. 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.*, **30**(6), 1447-1457.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.*, **99**(17), 7928-7940.
- Yaghoubi, K., Pazouki, M., Shojaosadati, S.A. 2008. Variable optimization for biopulping of agricultural residues by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Bioresour. Technol.*, **99**(10), 4321-8.
- Yu, H., Du, W., Zhang, J., Ma, F., Zhang, X., Zhong, W. 2010. Fungal treatment of cornstalks enhances the delignification and xylan loss during mild alkaline pretreatment and enzymatic digestibility of glucan. *Bioresour. Technol.*, **101**(17), 6728-6734.
- Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B., Divne, C., Nicholls, P., Haltrich, D. 2006. Cellobiose dehydrogenase-a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotropic fungi. *Current protein and peptide science*, **7**(3), 255-280.
- Zauner, E., Kuntzel, U. 1986. Methane production from ensiled plant material. *Biomass*, **10**(3), 207-223.
- Zeng, J., Singh, D., Chen, S. 2011. Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts. *Bioresour. Technol.*, **102**(3), 3206-3214.
- Zeng, Y., Yang, X., Yu, H., Zhang, X., Ma, F. 2012. The delignification effects of white-rot fungal pretreatment on thermal characteristics of moso bamboo. *Bioresour. Technol.*, **114**, 437-442.
- Zhang, R., Zhang, Z. 1999. Biogasification of rice straw with an anaerobic-phased solids digester system. *Bioresour. Technol.*, **68**(3), 235-245.
- Zhang, X., Yu, H., Huang, H., Liu, Y. 2007. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **60**(3), 159-164.

Annexes

Annexe 1. Analyse des sucres par CLHP

Colonne : Bio-Rad Aminex HPX-87P 300mm, 7.8 mm ;

Température de la colonne: 85°C ;

Température du détecteur d'indice de réfraction (refractive index detector RID) : 49°C ;

Phase mobile: eau pure HPLC grade ; Débit : 0,6 ml.min⁻¹.

Exploitation des données :

Les pertes en oses pendant l'hydrolyse acide, $\%S_i$ (i pour chaque sucre), sont prises en considération selon l'équation ci-dessous et en tenant compte des facteurs correctifs présentés dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** :

$$\%S_i = \frac{\text{Concentration détectée par HPLC, mg/L}}{\text{Concentration su avant l'hydrolyse, mg/L}}$$

Équation 21

Tableau 15. Facteur de correction des concentrations en sucres mesurées après hydrolyse chimique.

Sucre	Facteur correctif
D-(+)Glucose	0,90
D-(+)Xylose	0,88
D-(+)Galactose	0,90
L-(+)Arabinose	0,88
D-(+)Mannose	0,90

Cellulose :

$$\%Cellulose_{\text{sans extractif}} = \frac{\frac{CHPLC}{\%S_i/100} \times \text{Correction d'anhydro} \times \text{Volums filtrat} \times \frac{1g}{1000mg}}{m_e} \times 100 \quad \text{Équation 22}$$

Annexe 2. Quantification de la lignine soluble et la lignine insoluble

Lignine soluble :

$$\%LAS_{\text{sans extractif}} = \frac{UVAbs \times Volume_{\text{filtrat}} \times \text{fois de dilution}}{\varepsilon \times m_g \times \text{longueur de cuve}} \times 100$$

Équation 23

avec

$$Volume_{\text{filtrat}} = 86,73 \text{ ml}$$

$$\varepsilon = 110 L.g^{-1}.cm^{-1}$$

$$\text{longueur de cuve} = 1 \text{ cm}$$

$$\text{Facteur de dilution} = 20$$

Lignine insoluble :

Le calcul de la teneur en lignine totale est basé sur l'équation suivante :

$$\%lig_{\text{tot}} =$$

$$(\%LAI_{\text{sans extractif}} + \%LAS_{\text{sans extractif}}) \times \frac{(100 - \%extractif \text{ à l'eau} - \%extractif \text{ à l'éthanol})}{100}$$

Équation 24

Annexe 3. Méthode d'exploitation des résultats des analyses ATG - DSC

Nous allons utiliser 3 courbes présentes sur le thermogramme : le signal thermogravimétrique (TG) (courbe verte), le signal d'analyse calorimétrique différentielle (ACD) (courbe bleue) et la dérivée du signal thermogravimétrique (DTG) (courbe violette) (cf. Figure 24).

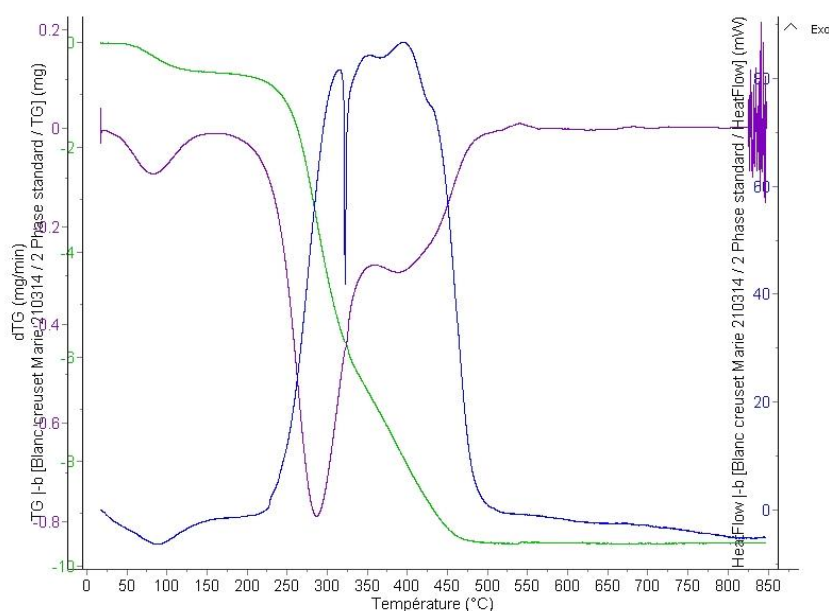


Figure 24 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique.

Cette dérivée nous permet de mieux situer le début et la fin d'une variation de masse. Lorsqu'une perte de masse se produit, un minimum de la DTG correspond au moment où la perte de masse est maximum et inversement avec un maximum de la DTG. Pour situer les bornes de la perte de masse, celles-ci se situent entre 2 maxima de la DTG (cf. Figure 25 et Figure 26).

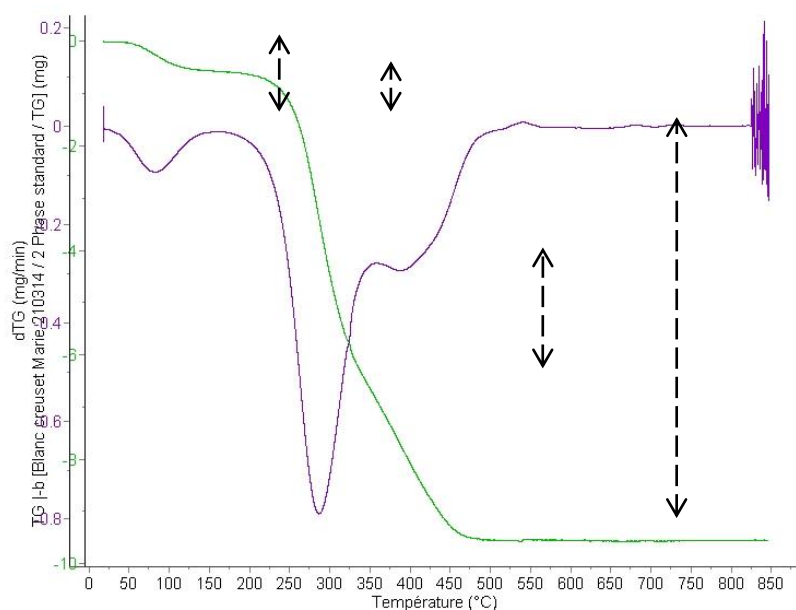


Figure 25 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique contenant que la courbe TG et DTG.

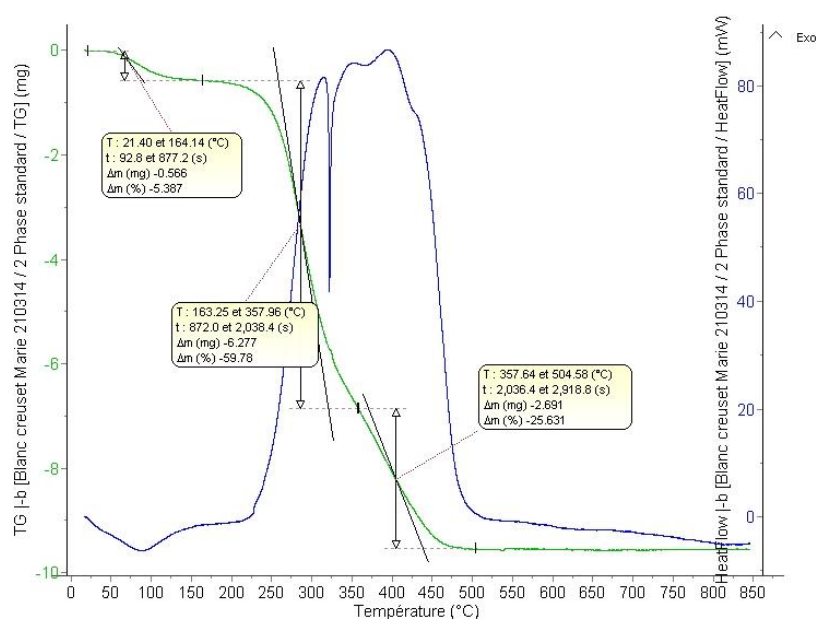


Figure 26 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique et interprétation des variations de masse.

Ensuite, pour connaître la quantité d'énergie dégagée par un phénomène, nous allons intégrer chaque pic de la courbe ACD. On peut là aussi se référer à la DTG afin d'avoir une approche du début et de la fin de l'intégration. Pour cela, le début et la fin de l'intégration du pic se fait aux alentours des maxima de la DTG. Il suffit par la suite d'ajuster les températures de début et de fin du pic afin d'obtenir une ligne d'intégration droite. (cf. Figure 27 et Figure 28).

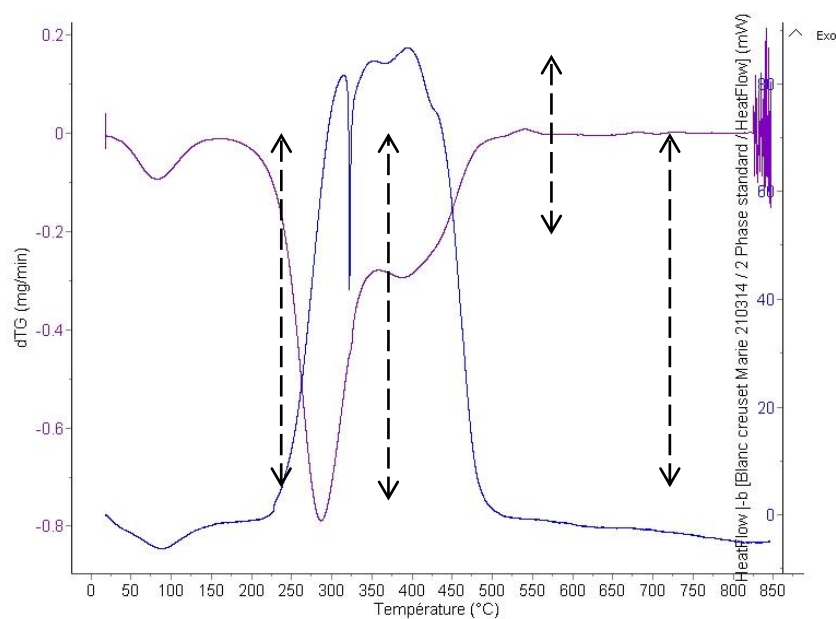


Figure 27 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique - courbe ACD et DTG.

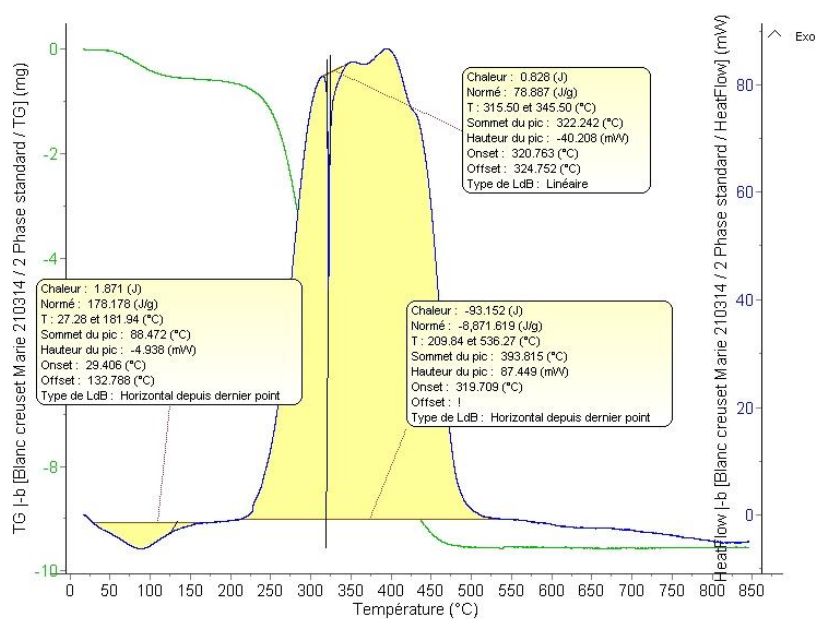


Figure 28 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique et intégration des pics ACD.

De plus, 3 domaines de température sont distingués et chaque domaine correspond à la décomposition thermique de la matière.

- 1^{er} domaine : $20 - 170 \pm 20^\circ\text{C}$

Les réactions endothermiques et la perte de masse sont ici liées principalement au phénomène de déshydratation de l'échantillon.

- 2^{ème} domaine : $170 \pm 20^\circ\text{C} - 390 \pm 20^\circ\text{C}$

Dans cette partie, la MO subit une combustion partielle. Le pic exothermique (ΔH_1) ainsi que la perte de masse (m_1) représenteraient la cellulose et l'hémicellulose composant l'échantillon.

- 3^{ème} domaine : $390 \pm 20^\circ\text{C} - 590 \pm 20^\circ\text{C}$

Ce domaine correspond à la poursuite de la combustion de la MO qui se caractérise aussi par un pic exothermique (ΔH_2) et une perte de masse (m_2) caractéristique de la lignine présente dans l'échantillon.

Attention !!! Ces deux derniers domaines ne forment pas chacun un pic distinctif, mais plutôt une superposition des deux pics et ce sont les données de ces pics (cf. Tableau 16 et Figure 29) qui vont nous permettre d'effectuer des calculs afin d'avoir les paramètres thermiques.

Tableau 16 : Données et paramètres thermiques définis.

m_i	Perte de masse associée au pic _i	mg
$m = m_1 + m_2$	Perte de masse totale des pics de la MO	mg
$\%m_1 = m_1 / (m_1 + m_2)$	% de perte de masse d'un pic par rapport à la perte de masse totale	%

	de la MO	
m_2/m_1	Rapport entre les pertes de masse des 2 pics de MO	
ΔH_i	Enthalpie de combustion	J/mg MO
$\%H_1 = \Delta H_1 / (\Delta H_1 + \Delta H_2)$	% de quantité de chaleur correspondant à un pic de la MO	%
$\Delta H_2 / \Delta H_1$	Rapport entre les enthalpies des deux pics de MO	
T_i	Température correspondantes aux maxima d'un pic ACD	°C

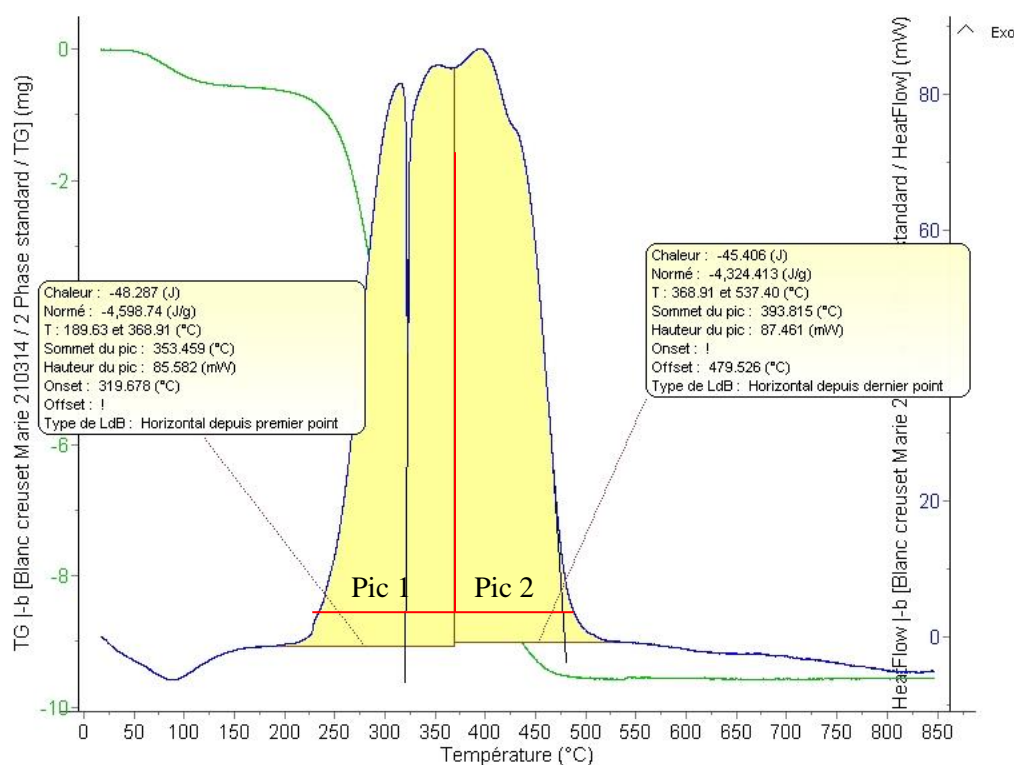


Figure 29 : Exemple de thermogramme d'un échantillon de biomasse lignocellulosique pour définir le Pic 1 et le Pic 2 utilisés pour les données thermiques.